



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 42 16 696 A 1**

21 Aktenzeichen: P 42 16 696.9  
22 Anmeldetag: 20. 5. 92  
43 Offenlegungstag: 28. 10. 93

51 Int. Cl. 5:  
**G 01 N 33/53**  
G 01 N 33/533  
G 01 N 33/58  
G 01 N 21/64  
G 01 N 27/416  
G 01 N 1/28

DE 42 16 696 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31  
10.04.92 DE 42 12 148.5

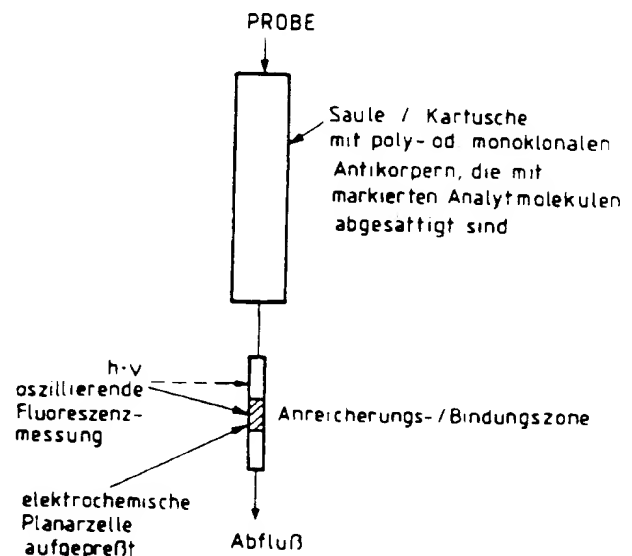
71 Anmelder:  
Deutsche Aerospace AG, 80804 München, DE

72 Erfinder:  
Cammann, Karl, Prof. Dr., 4400 Münster, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-DNA-komplementär-DNA- und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays

57 Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang- sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, mit schnellen und repetitiven Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei Immuno-Assays und ähnlichen Assays.



DE 42 16 696 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Die Erfindung richtet sich auf ein allgemein anwendbares Verfahren, das aus einer Kombination ausgewählter Schritte besteht und Vorrichtungen für extrem empfindliche und ungestörte Konzentrationsbestimmungen beliebiger Antikörper-Antigenpaare komplementärer Molekül-Rezeptorpaare, komplementärer DNA-Stränge sowie selektiver Gast-/Wirtsmolekülpaare. Ferner betrifft sie eine Vorrichtung zur Empfindlichkeits- und Selektivitätssteigerung bei Immuno-Assays, Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA und Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungs-Assays.

Die quantitative Analyse komplexer Stoffgemische unter Ausnutzung der sehr selektiven Antikörper-Antigen-Bindung (Schlüssel-Schloß-Prinzip) und der DNA-Paarbildung bei den sog. DNA-Sonden ist in der Biochemie und klinischen Chemie eine etablierte Analysemethode und dementsprechend weit verbreitet. Meist werden kompetitive Tests mit markierten Antigenen, Antikörpern oder DNA-Molekülen benutzt. Beim Radio-Immuno-Assay (RIA) ist das der Meßlösung zugesetzte Antigen (bzw. das Antikörpermolekül bei der Sandwich-Methode) radioaktiv markiert. Beim Enzym-Immuno-Assay (EIA oder das heterogene Enzym-Linked-Adsorbend-Assay, ELISA) ist an den betreffenden Markermolekülen ein sog. Marker-Enzym gebunden. Diese markierten Moleküle konkurrieren mit den zu messenden, unmarkierten Molekülen (zu bestimmender Stoff = Analyt) um die Bindung an den meist trägergebundenen Antikörper (bzw. DNA-Sequenz), so daß sich die unbekannte Menge Antigen (DNA-Art und Menge) bestimmen läßt, wenn zum Vergleich ein Test mit einem Antigen (DNA-Molekül) bekannter Konzentration durchgeführt wird. Die Meßsignale sind bei dieser Methode umgekehrt proportional zur Konzentration. Bei den sog. Sandwichtests werden markierte Antikörper benutzt. Diese binden sandwichartig an Antigenmoleküle an, die ihrerseits zuvor konzentrationsabhängig an trägergebundene Antikörper gebunden sind.

Die sehr spezifische Bindung zweier komplementärer Moleküle erlaubt natürlich auch umgekehrt die quantitative Bestimmung des größeren Partners (Antikörper-, Rezeptor-Analyse resp. des komplementären DNA-Moleküls (oder Bio-Oberfläche), welches mindestens in einem Teilbereich eine komplementäre DNA-Sequenz zur markierten Sequenz aufweist) und sind daher die wichtigsten biochemischen Analyseverfahren. Nachdem es inzwischen möglich ist, auch für kleinere Moleküle (Haptene) monoklonale Antikörper in beliebigen Mengen zu produzieren, werden diese immunologischen Methoden auch für die Umweltanalytik zunehmend bedeutsam. Beispielsweise kann man unter Verwendung monoklonaler Antikörper für die verschiedenen Dioxine die gesamten Analysenkosten dadurch erheblich senken, daß nur bei positivem Ergebnis des immunologischen Tests die sehr teure GC-MS Analyse durchgeführt werden muß (Screening).

Die inzwischen traditionellen immunologischen Bestimmungsverfahren (RIA und EIA bzw. ELISA) weisen erhebliche Nachteile auf, die hinlänglich bekannt sind. Entweder treten wegen der Verwendung radioaktiven Materials Entsorgungs-, Versand- und Lagerprobleme auf oder man muß mit einer Beeinflussung der immunologischen Reaktion durch das meist, verglichen zum relativ kleinen Antigenmolekül, voluminöse Enzymmolekül rechnen. Enzymmarkierte Antigen- oder Antikörpermoleküle (bzw. eines der Partner von Molekül-Re-

zeptor-, Gast-Wirtsmolekül-, DNA-komplementär DNA-Wechselwirkungsmethoden) weisen alle Nachteile enzymatischer Verfahren auf. Die Lebensdauer des Enzyms ist begrenzt und die enzymatische Reaktion (Biokatalyse) kann bei unbekannten Umweltmatrices durch Inhibitoren oder Enzymgifte (z. B. Schwermetalle) empfindlich gestört werden, so daß falsche Ergebnisse auftreten. Meist muß die enzymmarkierte Verbindung aus Stabilitätsgründen kühl gelagert werden. Wegen dieser abnehmenden Aktivität sind zusätzliche Kalibrierschritte erforderlich und die GLP-Richtlinien (Gute Labor Praxis), die bei quantitativen Analysen eingehalten werden müssen, erfordern durch Rückstellproben eine Menge der teureren enzymmarkierten Verbindungen. Auch ist eine Phasentrennung erforderlich, ein Substrat muß zugegeben werden, wodurch die Handhabung sehr kompliziert wird. Die erforderlichen Arbeitsschritte benötigen i.d.R. einige Stunden. Ohne Phasentrennung laufen die sog. homogenen Enzym-Immuno-Assays (EMIT) ab, die kompetitiv arbeiten und sich nur für kleine Antigenmoleküle eignen.

Über eine einfache und allgemein anwendbare analytisch-chemische Ausnutzung selektiver Molekül-Rezeptor Wechselwirkungskräfte, DNA-Paarbildungsreaktionen sowie der gleichermaßen selektiven Gast-Wirtsbeziehungen der supramolekularen Chemie zum Zwecke einer quantitativen Bestimmung oder gar zum Aufbau von entsprechenden Sensoren existieren nur wenige Vorarbeiten.

Der vorteilhafte Aufbau eines einfachen und preiswerten elektrochemischen Meßsystems, das in Form der Potentiometrie oder Amperometrie den geringsten apparativen Aufwand erfordert, scheitert in der Regel daran, daß der zu bestimmende Stoff (Analyt) nicht als potentialbestimmendes Ion, sondern als neutrales Molekül vorliegt bzw. nicht elektrochemisch selektiv umgesetzt werden kann. Die Verwendung optischer Methoden (Spektralphotometrie, Fluoreszenzmessung, Ellipsometrie, Surface Plasmon Resonance Spektroskopie, Methode der evaneszenten Welle, usw.) zur Erfassung der oben erwähnten spezifischen Molekül-Wechselwirkungen ist beschrieben worden. Einige können die immunologische Reaktion auch ohne markierten Partner aufgrund der Änderung des Brechungsindex an einer Phasengrenze erfassen, haben aber große Probleme bei kleinen Analytmolekülen (wie in der Umweltanalytik üblich) im Spurenbereich ( $< 1$  ppm), da die nicht spezifische Bindung von störenden Begleitstoffen, die sogar meist in einem großen Überschuß neben dem Analyten in einer realen Probe mitanwesend sind, empfindlichkeitslimitierend ist.

Optische Verfahren mit den üblichen Fluoreszenzmarkern, die eine Anregungswellenlänge im UV oder sichtbaren Bereich erfordern, benötigen einen hohen apparativen Aufwand, der einer weitverbreiteten Routineanwendung im Wege steht. Der Aufwand zur Stabilisierung der Lichtquelle, zur Monochromatisierung mittels eines streulichtfreien Monochromators, zur Vermeidung von Fremdlichteinflüssen, zur Empfindlichkeitssteigerung etc. erfordert apparative Aufbauten, die sehr komplex und damit teuer sind. Außerdem werden neben den fluoreszierenden Molekülgruppen des Markers auch viele Stoffe in typisch biologischen Matrices mitangeregt (z. B. Tryptophan u. a.), so daß ihre Fluoreszenz nicht von der des Markermoleküls unterschieden werden kann, was die Nachweisgrenze extrem verschlechtert. Lediglich die Markierung mittels spezieller Fluoreszenzmarker, die nach der Methode der zeitver-

zögerten Fluoreszenz arbeiten, kann diese Probleme umgehen. Diese Methode benötigt aber teurere Geräte und wird praktisch nur mittels sog. Enhancement-Schritte zur Steigerung der Empfindlichkeit durchgeführt, was aber einen zusätzlichen Arbeitsgang bedeutet.

In der deutschen Patentanmeldung DE 39 16 432 A1 von 1990 wird ein potentiometrisches Verfahren zur Detektion einer Immuno-Reaktion zwischen unmarkierten komplementären Partnern beschrieben, welches aber ebenfalls bei kleineren Analytmolekülen in einem Bereich unter 1 ppm anwendbar ist.

Bei Immuno-Assays, die wie die Affinitätschromatographie betrieben werden und bei denen eine Verdrängungsreaktion mit einem markierten Analytmolekül ausgenutzt wird, beschreibt der Stand der Technik bisher nur Messungen mittels Durchflußmeßzellen, bei denen die Wechselwirkungszeit (= reine Meßzeit) mit den messenden Größen (Licht, Strom etc.), durch die Strömungsgeschwindigkeit vorgegeben, relativ kurz (nur wenige Sekunden) ist. Eine derartig kurze Meßzeit erlaubt vor allem bei Durchflußmessungen keine hohe elektronische Dämpfung. Daher sind der elektronischen oder optoelektronischen Verstärkungstechnik durch das in den empfindlichsten Bereichen stark abfallende Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/R-Verhältnis) Grenzen gesetzt. Ebenfalls unmöglich sind bei dem schnellen Durchströmen der markierten Substanz durch den Durchfluß-Detektor Wiederholmessungen, die sich bei Mittelwertbildung ähnlich positiv auf das S/R-Verhältnis auswirken. Darüber hinaus benötigen Wiederholmessungen einen Bezugspunkt, d. h. eine Untergrundmessung (Blindwertmessung oder engl. blanc value), die eine entsprechende Vorrichtung verlangt.

Über eine einfache und quasi automatische Abtrennung der ebenfalls aus der immnologischen Reaktionszone austretenden Probenmatrix mit störenden Komponenten wird außer im Zusammenhang mit den heterogenen ELISA-Techniken, die einen zusätzlichen Abtrennungsschritt vorschreiben, im Stand der Technik nichts berichtet. Dies ist aber für richtige Messungen von zentraler Bedeutung und unabdingbare Voraussetzung bei repetitiven Messungen, bei denen sich natürlich Fehlmessungen ebenfalls addieren.

Eine Gleichstellung von Immunoreaktionen mit Rezeptorreaktionen bzw. DNA-Paarbildung und molekül-erkennenden Gast-/Wirtsmolekül-Einlagerungen bezüglich der erfindungsgemäßen, allgemein gültigen, sensorisch ausnutzbaren Anordnung wurde bisher nicht beschrieben, da die Markierung mit einem voluminösen Enzym diese selektiven Bindungsreaktionen sehr stark behindert (sterische Behinderung). Dies ist bei den relativ kleinen Redox-Systemen oder IR-fluoreszierenden Molekülen nicht der Fall.

Es besteht daher ein Bedürfnis für ein generell anwendbares Verfahren und eine Vorrichtung, die die bekannten Nachteile der direkt anzeigenden und auch der mit markierten immunologischen Partnern ablaufenden Verfahren (alle derzeitigen Immuno-Assays) vermeidet.

Die Aufgabe der Erfindung, die Empfindlichkeit zu erhöhen bei gleichzeitiger Verminderung der bekannten Querstörungen aller traditionellen Immuno-Assays und ähnlicher Verfahren, wird erreicht insb. durch die ausgewählte Kombination von mehreren Verfahrensschritten gemäß Anspruch 1.

Zur Erzielung der geforderten extrem niedrigen Nachweisgrenze im Spurenanalytensbereich werden erfindungsgemäß anstelle der anfälligen und ungenauen

enzymatischen Signal-Verstärkungsmethoden repetitierbare elektrochemische und optische Meßmethoden zusammen mit einer speziellen elektronischen Signalaufbereitung (Signal-Mittelwertsbildung) und entsprechenden Meßanordnungen angewandt.

Der zu bestimmende Immuno-Partner (Antigen oder Antikörper, Molekül oder dazugehöriger Rezeptor, Gastmolekül oder dazugehöriges Wirtsmolekül, DNA-Strang und dazugehörige komplementäre Sequenz) wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren entweder mit einem stabilen Redox-System oder einer stabilen, im Infrarotbereich ( $> 700 \text{ nm}$ ) fluoreszierenden Verbindung haltbar (z. B. kovalent gebunden) verbunden. Die Auswahl dieser beiden Marker-Molekülsorten erfolgte nach umfangreichen Vorversuchen und an Hand bestimmter Kriterien, die hiermit offenbart werden. Als Redox-Systeme eignen sich vorzugsweise anorganische oder organische Systeme mit hohen Standardaustauschstromdichten an inerten Metallelektroden. Bei den Fluoreszenz-Markern sind Moleküle, die mit preiswerten Laserdioden zur Fluoreszenz im fernen Infrarot ( $> 800 \text{ nm}$ ) angeregt werden können, die vorteilhaftesten Marker-moleküle.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist einfacher, empfindlicher, schneller, richtiger und daher letztendlich auch preiswerter als alle bisher beschriebenen Immuno-Assays. Vorteilhafter ist auch die direkte, extrem empfindliche und schnelle Erfassung von kleineren Antigenen, die nach den obenerwähnten Offenlegungsschriften mit den dort beschriebenen Verfahren nur mangelhaft oder überhaupt nicht möglich ist. Gerade hier existiert aber ein großer Anwendungsbereich für die neue Molekülanalytik (Schadstoffanalytik) vor allem im Bereich des Umweltschutzes oder der Überwachung von maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen sowie der klinischen Chemie (medizinischen Diagnose, Pathologie, Gerichtsmedizin).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann unterschiedlich durchgeführt werden:

In einer vorteilhaften Version wird das markierte Analytmolekül zuvor an dem immobilisierten Partner gebunden. Das unmarkierte Analytmolekül in der Probe verdrängt bei Kontakt mit den gebundenen, markierten Partnern sein markiertes Gegenstück (redox- oder fluoreszenzmarkiertes Antigen- oder Antikörpermolekül = markiertes Analytmolekül) aus der Oberflächenbindung, welches dann durch eine Flüssigkeitsströmung wegtransportiert wird.

In einer anderen Version wird der Probe das markierte Analytmolekül in einem bekannten Verhältnis zugesetzt und man läßt die Mischung mit den immobilisierten Immuno-Partnern (worunter alle obenerwähnten komplementären Systeme zu verstehen sind) in Wechselwirkung treten. Je nach der Konzentration des Analyten werden unterschiedliche Mengen des markierten Analytmoleküls kompetitiv gebunden, wobei eine umgekehrte Relation besteht. Bei beiden Versionen werden die nichtgebundenen oder freigesetzten markierten Analytmoleküle auf kleinstem Raum wieder mittels des betreffenden immunologischen (komplementären) Partners, der immobilisiert oder örtlich begrenzt und fixiert vorliegt, gesammelt, aufkonzentriert und durch Spülen von anhaftender Probenmatrix gereinigt.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung, bei der eine elektrochemisch und optisch zugängliche Oberfläche vorliegt, kann aber auch der Teil Vermessen werden, der nicht der Eluatsammlung entspricht. Beim kompetitiven Test, bei dem die Oberfläche der Vorrichtung vor

Kontakt mit der Probe mit immobilisierten Partnermolekülen bedeckt ist, die mit ihrem markierten Komplementärmolekül abgesättigt sind, kann auch die Abnahme der Intensität der Markierung gemessen werden, die der Analytmenge proportional ist. Bei dem anderen kompetitiven Test, bei dem markierte und unmarkierte Analytmoleküle zusammen zu den immobilisierten Komplementärmolekülen, die freie Bindungsstellen haben, zugesetzt werden, ist die Zunahme an markierten Molekülen in diesem Oberflächenbereich der Konzentration des Analyten umgekehrt proportional. Hier ist die Menge der markierten Moleküle, die die immunogene Zone ungebunden passieren, der Analytmenge direkt proportional. Bei der Messung zugänglichen Oberflächen kann man also bei einer derartigen immunologisch-analytischen Vorrichtung das Analysenergebnis doppelt (redundant) erhalten. Diese zweifache Bestimmungsmöglichkeit ist neu und verbessert die Zuverlässigkeit des gesamten Immuno-Assays erheblich. Fehler und Störungen können durch die mangelnde Übereinstimmung dieser beiden Meßwerte sofort erkannt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren läuft auf eine Doppelbestimmung des Analyten hinaus. Die Abnahme der über die immunogene Zone integrierten Signalintensität (konzentrationsproportional) muß bei einem Verdrängungsassay der betreffenden Zunahme in der "Molekülfänger"-Zone entsprechen (s. Abb. 2). Analoges gilt auch für die Methode, bei der das markierte Analytmolekül vor jeder Analyse der Probe in einem bekannten Verhältnis beigemischt wird. Durch ein Auffangen der nichtgebundenen markierten und unmarkierten Analytmoleküle in einer speziellen Fängerzone läßt sich aus der dort meßbaren Konzentration an markierten Analytmolekülen direkt auf die Konzentration der unmarkierten Analytmoleküle, die in der Probe vorliegen, schließen. Je höher die Konzentration an markierten Analytmolekülen nach dem Durchströmen der immunogenen Zone, desto höher die Analytkonzentration in der Probe.

Ein weiterer Vorteil (empfindlicher und ungestörter als bisherige Verfahren auf nichtenzymatischer Basis der Erfindung) ist die Abtrennung der nicht spezifisch gebundenen Matrixsubstanzen vor der eigentlichen Messung sowie die Sammlung oder Anreicherung der markierten Moleküle auf einer flachen Oberfläche, auf der unmarkierte Partnermoleküle mit freien Bindungsstellen fest angebunden sind, so daß sie die markierten Partner, die den anderen immunologischen Bindungsbereich ungebunden durchlaufen haben oder dort durch den unmarkierten Analyten freigesetzt (aus der Bindung verdrängt) wurden, spezifisch anbinden. Die auf einer flachen Oberfläche angebundenen markierten Analytmoleküle, deren Menge nach Kalibration eine Information über die in der Probe vorliegenden (unmarkierten) Analytmoleküle erlaubt, können dann, je nach Art der Markierung, elektrochemisch oder optisch bestimmt werden, wobei sowohl lange Meßzeiten mit hoher Dämpfung als auch zyklische oder repetitive Messungen mit elektronischer (oder rechnergestützter) Mittelwertbildung möglich sind. Nach den Gesetzen der Statistik läßt sich durch N Messungen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um den Faktor Wurzel-N verbessern.

Anstelle der spezifisch bindenden Immuno-Partner-Moleküle mit freien Bindungsplätzen als selektive "Molekülfänger" nach der primären kompetitiven Immuno-Reaktion können auch andere Sammelphasen verwendet werden. Bei lipophilen Analytmolekülen reicht dazu

eine zu durchströmende Zone, die mit Öl oder Wachs (oder PVC plus Weichmacher o. ä.) getränkt ist, aus. Alternativ kann dafür auch ein Material verwendet werden, daß in der reversed phase Chromatographie üblich ist (z. B. RP-18 stationäre Phase). Das letztere bietet sich insbesondere an, wenn ionisch vorliegende Analytmoleküle festgehalten werden sollen. Hier gibt man der Fließlösung ein entsprechend geladenes, lipophiles Gegenion zu. Dadurch kommt es zu einer Ionenpaarbindung im Öl oder Fett, welche eine Erschwerung der Passage der markierten Analytmoleküle durch diese Molekülfängerzone bewirkt. Sie werden sich bei einer strömenden Trägerlösung gegen Ende der lipophilen Zone anreichern und können so der empfindlichen Messung zugänglich gemacht werden.

Eine besonders einfache und elegante Vorrichtung stellt im Zusammenhang mit der Erfindung die Verwendung von teststreifenähnlichem chromatographischen Material dar. Hier kann sowohl die Papierchromatographie (erweitert um die Membranfiltermaterialien auf Celluloseacetat, -nitrat o. ä. Basis) als auch die Dünnschichtchromatographie Material-Lieferant sein (s. Abb. 2). Die Produktion der erfindungsgemäßen Vorrichtungen geschieht denkbar einfach und rationell. Im Bereich der umweltanalytischen Anwendung des hier offenbarten Verfahrens werden die entsprechenden poly- oder monoklonalen Antikörper bzw. Fab-Fragmente mit Hilfe bekannter Bindungstechniken (kovalente Immobilisierung mittels Spacermoleküle und Fc-Teil bindenden Komponenten) richtig orientiert (Bindungsstellen nach außen) auf über 75% der Teststreifenfläche aufgebracht. Nach Fixierung dieser analyterkennenden Makromoleküle auf der Teststreifenoberfläche wird der Anfangsbereich in eine Lösung getaucht, die nur markierte Analytmoleküle enthält. Dadurch werden alle Bindungsstellen mit diesem markierten Analytmolekül abgesättigt. Die Länge dieser immunogenen Zone entspricht dabei der Größe des Meßbereichs. Danach wird gründlich gespült, um rein adsorptiv gebundene, markierte Analytmoleküle zu entfernen. Der Rest des Teststreifens enthält nunmehr die analyterkennenden Antikörpermoleküle (oder bei den anderen analogen Reaktionen, die entsprechenden DNA's oder Wirtsmoleküle) mit freien Bindungsstellen und dient als Molekülfänger für die spätere Messung. Zum Abschluß dieser Sammelzone kann vorteilhafterweise eine dünne Zone mit Dialysier-Eigenschaften verwendet werden.

Dadurch wird erreicht, daß der fließende Grundelektrolyt (durch die Art der Antikörpermoleküle bestimmt) zwar diese Zone passieren kann, die größeren markierten Analytmoleküle aber zurückgehalten werden und dadurch in einer extrem kleinen Zone auch angereichert werden. Diese Anordnung kann auch in durchsichtigen Glasröhren oder preiswerteren Plastikröhren, gefüllt mit dem betreffenden chromatographischen Material, durchgeführt werden. Falls diese Röhre mit der Dialysiermembran abgeschlossen wird, kann man auch auf andere Sammelzonen verzichten. Hier muß nur der ungehinderte Zugang der optischen Strahlengänge garantiert werden, die hier vorzugsweise nicht seitlich der Röhre, sondern axial angebracht werden. Bei redoxmarkierten Analytmolekülen wird diese Dialysierfolie demontierbar angebracht, so daß deren Innenseite mit den aufgesammelten, markierten Analytmolekülen, die in der primären Immunozone analytproportional freigesetzt worden sind, der planaren elektrochemischen Zelle zugänglich gemacht werden. Selbstverständlich kann letztere auch zuvor durch mikroelektronische Methode

fest auf die Innenseite der Dialysierfolie aufgebracht sein.

Die Elektrodenflächen sind miniaturisiert und erfordern nur minimale Edelmetallmengen, so daß auch in diesem Fall die Prüfröhrchen-ähnlichen Gebilde nach einer Messung verworfen werden können. Die Röhrenanordnung erfaßt wegen der größeren Menge an immobilisierten analyterkennenden und -bindenden Antikörpermolekülen einen größeren Konzentrationsbereich des Analyten, d. h. die Kalibrierkurve geht später als bei den planaren Anordnungen in einen Sättigungsbereich über. Die Auswertung kann auch über die verdrängten Strecken (oder integriert davon) erfolgen (s. Abb. 2). Dazu kann ein preiswerter Laserdioden-Scanner verwendet werden.

Zur Anreicherung der freigesetzten oder nicht gebundenen markierten Analytmoleküle kann sowohl bei der Verdrängungsmethode als auch beim kompetitiven Verfahren (jeweiliger Zusatz von markierten Analytmolekülen zu Beginn des Assays) auch eine freie Endzone der oben erläuterten Anordnungen dienen, bei der aber das Lösungsmittel verdampft. Die ausgewählten, stabilen Redox-Marker-Moleküle sowie die IR-Fluoreszenzmoleküle vertragen dabei auch Temperaturerhöhungen. Bei Antikörperverträglichkeit lassen sich auch leichter verdampfbare Lösungsmittel zu Effizienzsteigerung verwenden, wobei auch eine Zudosierung nach der primären immunogenen Zone möglich wird. Wichtig ist, daß die Verdampfung zur Konzentrierung der Marker-moleküle auf eine kleine Zone (Bereich) beschränkt wird. Weil dadurch das Lösungsmittel die zu detektierenden Moleküle dorthin transportiert bevor es verdampft und seine Transportfracht dort zurück läßt. Die Abb. 1 bis 2 verdeutlichen anhand von Skizzen die verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten.

Die erfindungsgemäß optimierte elektrochemische Meßmethode stellt eine zyklische Voltammetrie in Verbindung mit einem stabilen Redox-System dar, wobei sich letzteres von allen möglichen dadurch auszeichnet, daß es eine besonders hohe Standardaustauschstromdichte besitzt. Die zyklische Voltammetrie garantiert bei Dünnschicht-Meßzellen, daß nettomäßig keine Meßsubstanz elektrochemisch umgesetzt, d. h. verbraucht wird. Hierbei wird stets nur oxidiert und reduziert. Die höchste Meßempfindlichkeit wird erfindungsgemäß dann erzielt, wenn der Potentialbereich, in dem die Arbeitselektrode(n) zyklisch betrieben wird, das Halbstufenpotential des Redoxmarkers einschließt ( $+/- 200-600$  mV). Bei hohen Potentialänderungsgeschwindigkeiten ( $> 500$  mV/sec Scanrate) entstehen bei Arbeitselektroden  $> 10 \mu\text{m}$  anodische und kathodische Stromspitzen, die der Konzentration des Redoxsystems proportional sind. Je höher die Scanrate desto größer werden die Stromspitzen, was einer Empfindlichkeitssteigerung gleichkommt. Werden als Redox-Marker, Systeme mit den höchsten Standardaustauschstromdichten (z. B. Ferrocenverbindungen, Rutheniumkomplexe, Hexacyanoferrat II/III,  $J^{-}/J$  u. a. verwendet, dann stören nicht vollständig abgetrennte Redoxsysteme aus der Probenmatrix wesentlich weniger, wenn mit kurzen Zykluszeiten (schneller Spannungsrampen) gearbeitet wird. Die besten, reversiblen Redoxsysteme lassen hierbei durchaus über 1000 zyklische Voltammogramme pro Sekunde (1000 Hz) zu. Restbestände von weniger reversiblen, eventuell störenden Redoxsystemen aus der Probenmatrix lassen sich elektrochemisch nicht so schnell umsetzen und erzeugen daher auch kein Meßsignal (Stromfluß).

Alternativ können andere elektrochemische Methoden angewandt werden, die zu keinem Verbrauch oder Netto-Umsatz des reagierenden Systems führen, d. h. auch die Methode der Pulsvoltammetrie oder der differentiellen Pulsvoltammetrie oder der Square-wave Voltammetrie sind hierzu geeignet, lassen sich aber aus prinzipiellen Gründen nicht so schnell zyklisch betreiben.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Verfahrensschritt, der vorteilhafterweise zur gewünschten extremen Empfindlichkeitssteigerung führt, liegt in einer speziellen Kompensationsmethode für den bei schnellen Arbeitselektrodenpotential-Scanraten zunehmenden kapazitiven Strom, der den Signaluntergrund bildet. Dazu wird ein computergesteuertes Auswertsystem verwendet, das mittels eines schnellen AD-Wandlers wie ein Scanner arbeitet. Die Kompensation des nicht faradayischen Untergrundstromes, die ebenfalls zur Empfindlichkeitssteigerung einen entscheidenden Anteil beiträgt, kann auf zwei Arten erfolgen, die für sich allein oder zusammen verwendet werden können. Bei Arbeitselektroden mit Durchmessern über  $10 \mu\text{m}$  wird die Kanalanordnung des Scanrecorders bei Erreichen des Potentialumkehrpunktes ebenfalls umgekehrt, als ob mit einem X-Y-Schreiber die Spannung an der Arbeitselektrode gegen den fließenden Strom (engl. C-V Diagram) aufgezeichnet würde. Da dies einer einfachen Signaladdition gleich kommt, kompensieren sich pro Meßkanal (Zeitfenster oder Potential) gleich große anodische und kathodische Ströme. Lediglich bei den um ca. 60 mV auseinanderliegenden Stromspitzen ist das nicht der Fall.

Ein weiterer Schritt, der für das Ziel dieser Erfindung wesentlich von Vorteil ist, ist die erst durch schnelle Wiederholmessungen ohne Verbrauch der gemessenen Substanz mögliche elektronische Mittelwertbildung. Mit einem Signalmittelwertbildner läßt sich zusätzlich dabei auch noch das Signal/Rauschverhältnis (S/R) drastisch steigern, weil man mehrere Tausend Zyklen mitteilen kann. Da man bei reversiblen Redoxsystemen leicht weit über 100 Potentialzyklen pro Sekunde ( $> 100$  Hz) durchscannen kann, ergibt sich hier beispielsweise schon in einer Sekunde eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 10. Bei Meßzeiten, die denen der Immuno-Assay-Verfahren mit Enzymmarkern entsprechen, ergeben sich Verbesserungen dieses die Nachweisgrenze bestimmenden S/R-Verhältnisses um mehrere Größenordnungen, ohne daß die Nachteile der empfindlichen Eiweißmoleküle (Enzyme) hier stören. Das zweite Verfahren zur Unterdrückung des störenden kapazitiven Stromuntergrundes bei der zyklischen Voltammetrie verwendet als Arbeitselektrode ein Ultramikroelektroden-Array mit Einzelelektroden durchmessern von unter  $10 \mu\text{m}$ . Hier entstehen keine anodischen und kathodischen Stromspitzen mehr, sondern eine Stromstufe mit gut ausgeprägten Plateaus. Die Stufenhöhe ist ähnlich wie bei der Polarographie der Konzentration des elektrochemisch umgesetzten Redoxsystems (Markermoleküls) proportional. Die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet hierzu eine planare Array-Anordnung von ca. 2000 Einzelelektroden mit  $3 \mu\text{m}$  Durchmesser, bei der die Bezugs- und Gegenelektrode bereits optimiert in die Oberfläche integriert vorliegt. Hier hat sich nur eine von vielen möglichen geometrischen Anordnungen als geeignet erwiesen (siehe Abb. 3).

Die neue Anwendung der zyklischen Voltammetrie zur Erzielung extremer Meßempfindlichkeiten bei Re-



doxsystemen oder Markermolekülen mit Redoxgruppen ist dadurch möglich, weil durch die abwechselnde Oxydation und Reduktion kein Verbrauch des Meßstoffes auftritt. Eine Wegdiffusion des Redoxsystems wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß eine Dünnschichtzellen-Anordnung gewählt wird. Hierbei werden die Arbeitselektrode(n) sowie die Gegen- und Referenzelektrode gegen die mit Grundelektrolyt befeuchtete Oberfläche mit den redoxmarkierten Partnermolekülen gedrückt. Gegebenenfalls können die unmarkierten Partnermoleküle, die die redoxmarkierten Moleküle binden, auch direkt auf oder unmittelbar neben der Elektrodenoberfläche immobilisiert sein. Die Zyklisierung ist bei Nachweisgrenzen unter 1 ppb (Redox-System) notwendig, denn bei solch extrem kleinen Konzentrationen müssen möglichst alle Moleküle elektrochemisch erfaßt werden. Dann entspricht eine Stromstärke von einem  $\mu\text{A}$  einer umgesetzten Substanzmenge von ca.  $10^{-10}$  mol/sec. Derzeitig erlauben gute elektrochemische Meßzellen auch noch zuverlässige Strommessungen im nA-Bereich, was einer tausendfach kleineren Umsatzrate entspricht. Durch die Signalmittelwertbildung werden nunmehr Pico- und Femto-Ampereströme meßbar, was zu Umsatzraten von  $10^{-16}$  resp.  $10^{-19}$  mol/sec führt.

Bei der optischen Detektion erhält man die gewünschte Empfindlichkeitssteigerung durch die Kombination von mehreren, mindestens zwei Verfahrensmaßnahmen.

Als erste Maßnahme verwendet man Markermoleküle, die im IR stark absorbieren, und im noch fernerem Infrarot fluoreszieren, weil dadurch der störende Fluoreszenzuntergrund von einigen Eiweißmolekülen (z. B. bei biologischen Matrices) nicht auftritt und die preiswerten Laserdioden als Anregungsquelle hoher spektraler Leuchtdichte besonders vorteilhaft sind. Das emittierte Laserlicht erlaubt durch seine geringe Strahlkonvergenz besonders exakte Abgrenzungen des Meßfensters. Als weitere Maßnahme verwendet Fluoreszenzmarkermoleküle, deren Fluoreszenz besonders langsam abklingt, so daß man diese Fluoreszenz gut von der schnell abklingenden der störenden Moleküle in der Probenmatrix abtrennen kann. Im Gegensatz zu einer kommerziell erhältlichen Anordnung, bei der einfach das Anregungslicht durch einen Shutter unterbunden wird, und die eigentliche Messung des Fluoreszenzlichtes erst nach einigen Millisekunden (nach völligen Abklingen der Störfluoreszenzstrahlung) beginnt und über eine gewisse Zeit integriert wird, geschieht die Auswertung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren über eine direkt und schneller messende elektronische Berücksichtigung der langsameren Abklingzeit. Hierzu wird ein Lock-In Verstärker benutzt, der eine frequenz- und phasenselektive Verstärkung ermöglicht. Die Unterdrückung der störenden Fluoreszenz mit der schnellen Abklingzeit geschieht hier durch eine geeignete Wahl des Phasenwinkels am Meßgerät. Vorteil dieser Methode gegenüber der Zählratenmethode (Photonenzählung) der kommerziellen Version ist die höhere Empfindlichkeit, weil die frequenzselektive Verstärkung nur einen Bruchteil des meist weißen elektronischen Rauschens des Photo-Empfängers verstärkt und weil bei höheren Licht-Chopper Frequenzen gearbeitet werden kann, was die Anzeigegeschwindigkeit drastisch erhöht, so daß auch Durchflußmessungen, wie bei der FIA üblich, noch entsprechend sensitiv durchgeführt werden können.

Diese u. a. Vorteile werden bei der Erfindung erhalten:

ten:

A) eine Art Affinitätschromatographischer Säule oder auch eine offene oder der optischen und elektrochemischen Messung zugängliche Oberfläche eines beliebigen Trägermaterials mit immobilisierten Partnermolekülen zu dem zu bestimmenden Molekül (Analyt);

B) eine gleichartige der Messung zugängliche "Sammeloberfläche" für freigesetzte markierte Analytmoleküle (im Falle einer Verdrängungsreaktion auf obiger Säule oder Oberfläche, die möglichst vollständig mit markierten immunogen gebundenen Analytmolekülen belegt ist, durch unmarkierte Analytmoleküle);

C) eine erfindungsgemäße flache elektrochemische Meßzelle in einer aus zwei oder drei Elektroden bestehenden potentiostatischen Schaltung mit einer oder mehreren Arbeitselektroden, die eine Zyklovoltammetrie im elektroaktiven Bereich des betreffenden Redoxsystems (repetitive Oxidation und Reduktion) durchführt und die in unmittelbarem Kontakt mit der "Sammeloberfläche" oder der unter A) genannten gebracht werden kann;

D) eine Fluoreszenzanordnung, die mittels Laserdioden zur Fluoreszenz bei Emissionswellenlängen  $> 700$  nm anregt und die schnell zwischen einem unmarkierten Untergrund und den Stellen, wo die optisch markierten Analytmoleküle auf den betreffenden Oberflächen festgehalten werden hin und her oszilliert (alternativ können auch Fluoreszenzmarker verwendet werden, die die Methode der zeitverzögerten Fluoreszenz ermöglichen, wobei aber hier die direkte und schnelle Messung mittels eines elektronischen phasenselektiven Verstärkers erfolgt, die ebenfalls mit Hilfe von Lichtleitern schnell zwischen einem unmarkierten und markierten Untergrund hin und her oszillieren kann).

E) einen elektronischen Signalmittelwertbildner oder eine computergestützte Aufaddition von Signal-Zeit-Kurven (Zeit proportional zur Spannung bei der elektrochemischen Detektion oder zum Meßort beim optischen Verfahren). Dabei mittelt sich ein statistisches elektronisches Rauschen in den höchsten Empfindlichkeitsbereichen zu Null.

F) Falls bei der auswertenden Messung sowohl die Änderung der markierten Analytmoleküle in der primären immunogenen Zone als auch die in der Sammelzone erfaßt wird, kann man neben einer Doppelmessung auch durch Quotientenbildung eine Art innere Standardisierung durchführen. Dies verbessert die Zuverlässigkeit der Messungen ähnlich wie bei der internen Standardisierung von emissionsspektroskopischen Methoden.

Die Oberfläche mit dem immobilisierten immunologischen Partnermolekül zum Analyten sollte im Interesse eines großen Meßbereichs hoch beladen sein. Auch muß das betreffende Molekül mit einer richtigen Orientierung (Epitop-Bereich außen) dort immobilisiert sein. Dies läßt sich u. a. auch unter Zuhilfenahme eines geeignet gewählten elektrischen Feldes (oder Stromes) an der Phasengrenze Trägeroberfläche/Meßlösung bewerkstelligen. Dadurch kommt es zu einer gerichteten Immobilisierung dieser Partner, ohne daß teure Speziesubstanzen (als übliche Spacermoleküle) dafür benötigt werden. Die gerichtete Immobilisierung ergibt zusammen mit einer hohen Immobilisierungsdichte eine hohe

Meßempfindlichkeit und einen großen Meßbereich. Alternativ können die immobilisierten Partnermoleküle aber auch durch die bekannten Techniken mittels Festteil bindender Spacermoleküle (bei der im Umweltanalytikbereich üblichen Immobilisierung von Antikörpern) an Trägeroberflächen (z. B. Glas-Beads, chromatographische stationäre Phasen, Mikrotiterplatten etc.) angebunden werden.

Als besondere Variante der Ausführungsbeispiele bietet sich auch Papier als preiswerter Träger an. Hier kann sowohl laborübliches Filterpapier als auch Membranfilter auf der Basis von Cellulose oder anderer Materialien dienen. Auch chromatographische Dünnschicht-Träger sind hierfür hervorragend geeignet, da sie oberflächlich leicht zu modifizieren sind. Eine bevorzugte Art sind in diesem Zusammenhang Dünnschichtplatten mit oder ohne Fluoreszenzgrundmarkierung, die schon in ein sog. Reversed Phase (RP-Material) modifiziert wurden. Hier gelingt die gerichtete Immobilisierung der Partner Molekülsorte (d. h. des jeweils nicht den Analyt darstellenden Partners dieser sich gegenseitig bindenden komplementären Moleküle) dann besonders gut, wenn man diesen Molekülen gezielt gegenüber dem Epitopbereich eine oder mehrere langkettige aliphatische Reste (C<sub>6</sub>—C<sub>25</sub>) ansynthetisiert oder bei Antikörpern die gentechnisch erzeugten Fab-Fragmente mit den spezifischen Bindungsstellen lipophile Molekülgruppen an der gegenüberliegenden Molekülstelle erzeugen läßt. Die lipophilen Reste der zu immobilisierenden Moleküle tauchen dann in die aliphatische Molekülbürste der Trägeroberfläche ein und werden so bei höchster Dichte ohne Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens fixiert. Sie können aber bei Denaturierung oder Desaktivierung wie in der Chromatographie üblich eluiert werden, so daß der Träger für eine Immobilisierung mit frischen Molekülen zur Verfügung steht. Bei Verwendung von Dünnschichtplatten auf Basis einer Aluminiumfolie läßt sich letztere auch elegant bei der elektrochemischen Detektionsmethode als Gegenelektrode verwenden.

Dieser Prozeß kann auch dynamisch im Rahmen einer Fließinjektionsanalyse automatisiert werden, d. h. auf die unbeladene RP-Oberfläche werden zunächst die zu immobilisierenden Moleküle (ohne gebundenes Analytmolekül mit Marker aber auch mit) gegeben bevor nach einer Spülung zum Entfernen des Überschusses im Fall der unbeladenen Moleküle die markierten Analytmoleküle bis zur Absättigung über die Oberfläche geleitet werden. Nach einer erneuten Spülung kann dann die Probe aufgegeben werden. Die Verwendung von zugänglichen flachen Oberflächen für die Immobilisierung der Partnermoleküle kann einen Verfahrensschritt ersparen, denn man kann die Menge der dort gebundenen markierten Analytmoleküle bei beiden Versionen (Vorimmobilisierung mit markierten Analytmolekülen und Konkurrenzbindung von der mit der Probe zugesetzten markierten Analytmolekülen) sowohl mit der planaren elektrochemischen Meßzelle (durch einfaches Aufpressen auf die Oberfläche) als auch mit der optischen Fluoreszenzmethode leicht bestimmen ohne eine zusätzliche Sammeloberfläche zu benutzen.

Bei beiden Detektionsmethoden ist es wichtig, daß störende Stoffe aus der Probenmatrix vor den eigentlichen Messungen fortgespült werden. Dies erfolgt durch reine, gepufferte Elektrolytlösung, die sowohl die Stabilität der Biomoleküle unterstützt als auch den Grundelektrolyt für die elektrochemische oder optische Detektionsart darstellt.

Als Redox-Systeme werden bei der Erfindung diejenigen ausgewählt, die an dem verwendeten Arbeitselektrodenmaterial (Platin, Gold, anderes Edelmetall) die höchsten Standardaustauschstromdichten zeigen. Hierzu zählen von allen möglichen Redoxsystemen vorzugsweise nur die besonders reversiblen Systeme, wie die auf der Basis von Ferrocen, Rutheniumkomplexen, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid etc. Besonders vorteilhafte Redoxsysteme haben ein Redoxpotential in der Nähe desjenigen von Sauerstoff, so daß sie von letzterem nicht gestört werden und man in diesem Fall die zyklische Voltammetrie auch ohne Inertgasspülung durchführen kann.

Bei der elektrochemischen Zelle läßt sich besonders vorteilhaft auch eine planare Mikroelektroden-Array-Anordnung einsetzen, weil bei Einzelelektroden durchmessern < 10 µm die Vorteile von Ultramikroelektroden auftreten. Letztere sind: Redox-Stufen statt Peaks im Voltammogramm, Verminderung des Verhältnisses von kapazitiven zu faradayschen Strom, Rührunabhängigkeit, quasi-verbrauchslose Messung schon ohne die Spannung zu zyklisieren u. a.

Als besonders vorteilhafte Molekülklasse für die Fluoreszenzmarkierung bieten sich z. B. an Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-(4'-chloro-7'(3"-ethyl-2"-benzothiazolinyli)-3',5'-(1'''-propanediyl)-1',3',5'-heptatrien-1'-yl)-3-ethylbenzothiazoliumbromid große Porphyrinringe oder geeignete Phthalocyanine an (siehe Abb. 4). Sie lassen sich durch die preiswerten langwelligen monochromatischen und fremdlichtfreien Laserlichtquellen anregen und erzeugen eine Fluoreszenz in einem Wellenlängenbereich, wo kaum andere Moleküle stören. Die Verwendung von Laserdioden mit entsprechenden IR-empfindlichen Halbleiterdetektoren erlaubt besonders kleine Meßaufbauten (z. B. Handmeßgeräte).

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Arbeitsweisen werden anhand von Beispielen noch näher erläutert:

#### Beispiel 1

Verdrängung des markierten Analytmoleküls vom immunologisch präparierten Oberflächenbereich durch das unmarkierte Analytmolekül in der Probe:

Eine vorteilhafte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung und des erfindungsgemäßen Verfahrens beruht auf einer kompetitiven Reaktion zwischen markiertem und unmarkiertem Analytmolekül. Hier kompensieren sich nichtspezifische Anbindungen, da sie in beiden Fällen im gleichen Ausmaß auftreten. Wünschenswert ist ferner, daß das unmarkierte Analytmolekül eine etwas geringere Bindungskonstante als das markierte aufweist, um es effektiver verdrängen zu können. Dies ist in der Regel der Fall, da die kovalente Verknüpfung mit einem relativ großen Markermolekül die Antikörper-Antigen-(bzw. allgemein: Molekül-Komplementärmolekül-) Bindung schwächt, weil sich beide Moleküle nicht mehr optimal nähern können.

Als Modellanalyt wurde in diesem Beispiel Humanserumalbumin (HSA) gewählt. Als immobilisiertes Partnermolekül wurde der dazugehörige Antikörper (anti-HSA) verwendet. Die anti-HSA Antikörper wurden mit den bekannten Immobilisierungstechniken an die Oberfläche von Sepharose-Material kleiner Korngröße (150 µm) angebunden und mit fluoreszenzmarkierten HSA belegt. Als Fluoreszenzmolekül wurde eine Europiumchelate (BCPDA) gewählt. An ein HSA Makromolekül konnten mehrere fluoreszierende Chelatkomplexe

kovalent angebunden werden (20–30). Die Europiumchelativbindung wurde in diesem Beispiel anstelle des IR-Licht emittierenden Markers genommen, weil die hier auftretende Fluoreszenz wesentlich langsamer abklingt als die der störenden Probenmatrix (Eiweißmoleküle bei biologischen Proben). Gemessen wurde am Ende einer kleinen Säule, die mit den Sepharose-Material und dem markierten Immunkomplex beladen war. Bei Zugabe von unmarkierten HSA wurde das mit dem Fluoreszenzmarker versehene von der Oberfläche der mit HSA-Antikörpern beladenen Sepharose-Partikel verdrängte HSA Molekül in einer Durchflußmeßzelle vermessen. Dazu wurde Licht der Wellenlänge 350 nm verwendet, dessen Strahlengang durch einen optischen Chopper mit einer Frequenz von 140 Hz zerhackt wurde. Im rechten Winkel zum Anregungslicht wurde das Fluoreszenzlicht gemessen. Als Lichtdetektor wurde ein Photomultiplier verwendet und am Lock-In Verstärker ein Phasenwinkel von 0° eingestellt. Die Abb. 5 zeigt die Signale, die durch die Zugabe von unmarkiertem HSA gemessen werden können. Sie sind der HSA-Konzentration der auf die Säule aufgegebenen Probe proportional. Durch diese Meßtechnik lassen sich pro Zeiteinheit wesentlich mehr Proben analysieren, als mit der Photonen-zählung, die auch der FIA-Technik verschlossen bleibt. Neben HSA konnten durch die Immobilisierung entsprechender mono- und polyklonaler Antikörper auch andere Analyte, wie Atrazin oder andere Schadstoffe sehr empfindlich im sub ppm-Bereich mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

#### Beispiel 2

Elektrochemische Detektion von Redox-markierten Analytmolekülen:

Als Analyt wurde das umweltrelevante Atrazin gewählt. Letzteres wurde durch Standardmethoden der organischen Synthese in 6 Stufen mit einem modifizierten Ferrocen-Molekül kovalent verknüpft. Das ausgewählte, sehr reversible Redox-System mußte zuvor in eine wasserlösliche Form durch Anfügen stark polarer Seitenketten überführt werden. Die einzelnen chemischen Syntheseschritte, die — ausgehend vom kommerziell erhältlichen Ausgangsprodukt — notwendig waren sind in Abb. 6 aufgeführt.

Die letzte Verbindung, das redoxmarkierte Atrazin wurde nach Reinigung sowohl für die Verdrängungsmethode als auch für die kompetitive Methode in einem Atrazin-Assay eingesetzt. Die entsprechenden Antikörper wurden von Hock et al. in der Literatur beschrieben (1,2). Die Abb. 7 zeigt zyklische Voltammogramme dieses redoxmarkierten Atrazins in extrem hoher Verdünnung auf einer Trägeroberfläche. Bedingt durch den unmittelbaren Kontakt des Redoxsystems mit der Arbeitselektrodenoberfläche und dem Nichtvorhandensein von andiffundierenden oder abdiffundierenden Redoxmolekülen ergeben sich im zyklischen Voltammogramm schärfere Peaks als üblich. Dieser Effekt wirkt auch empfindlichkeitssteigernd.

#### Beispiel 3

Steigerung der Nachweisgrenze durch repetitive elektrochemische Oxidation mit anschließender Reduktion:

Als reversibles Redox-System wurde Hexacyanoferrat (II/III) in einem Verhältnis von etwa 1 : 1 gewählt. Die typische Nachweisgrenze für dieses System bei der

klassischen zyklischen Voltammetrie liegt im millimolaren Konzentrationsbereich. Durch die Methode der elektronischen Signalmittelwertbildung, die hier wegen der verbrauchslosen Meßtechnik angewandt werden kann, lassen sich, wie Abb. 8 zeigt, noch extrem geringe Redoxkonzentrationen weit unterhalb des mikromolaren ( $\mu\text{mol/L}$ ) Bereiches mit einem sehr guten Signal/Rauschverhältnis quantitativ bestimmen. Bei einer Zyklusfrequenz von ca. 1000 Hz können beispielsweise in einer Sekunde 1000 Oxidations- und Reduktionsreaktionen durchgeführt werden, was bezüglich des elektrochemischen Signals gleichbedeutend mit einer zehntausendfach höheren Redoxmittelkonzentration (verglichen zur üblichen 0,1 Hz Arbeitsweise) ist oder einer entsprechend erhöhten Elektronentransferzahl entspricht, was gleichbedeutend wäre mit einem Analytmolekül, an dem eine entsprechende Anzahl von Ein-Elektronen-Redoxmolekülen angebunden wären.

#### Beispiel 4

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils bei schnellen zyklischen Voltammogrammen durch Anwendung der zyklischen Mittelwertbildung:

Bekanntlich tritt bei schnellen Potentialänderungsgeschwindigkeiten wegen der entsprechenden Umladung der Doppelschichtkapazität an der Arbeitselektroden-Grenzfläche ein sog. kapazitiver Strom auf, dessen Größe leider proportional zur Änderungsgeschwindigkeit ist, so daß eigentlich eine extrem schnelle Zyklusgeschwindigkeit bei der zyklischen Voltammetrie ausgeschlossen sein sollte, weil dieser Anteil den des betreffenden Redox-Peaks (faradayscher Strom) bei weitem übersteigt und zu Voltammogrammen führt, wie sie in Abb. 9 dargestellt werden. Führt man hingegen bei Makro-Arbeitselektroden die Spannungskoordinatenwerte ähnlich wie bei einem X-Y-Schreiber rückwärts zählend auf die einzelnen Digitalkanäle des Mittelwertbildners oder Scan-Recorders mit dieser Vorrichtung, so führt die Umkehrung des Vorzeichens der Stromstärke bei der Aufaddition in ein und denselben Kanal (der einem genau bestimmten Arbeitselektrodenpotential zugeordnet ist) zu einer Kompensation des kapazitiven Stromanteils. Dies geschieht nahezu vollständig, da der Kapazitätsstrom bei konstanter Doppelschichtkapazität (bei gleichem Arbeitselektrodenpotential bis auf das Vorzeichen der Potentialänderungsgeschwindigkeit  $dU/dt$  proportional ist. Lediglich die faradayschen Strompeaks, die proportional der Konzentration des Redoxsystems sind, werden durch diesen Schaltungstrick nicht kompensiert, da sie bei unterschiedlichen Potentialen ablaufen. Man erhält also ein rauscharmes, gemitteltes zyklisches Voltammogramm, daß wie in Abb. 8e gezeigt, aussieht. Erst durch diese schaltungstechnische und elektronische Vorrichtung ist es möglich, mit Potentialzyklusraten von weit über 100 Hz zu arbeiten.

#### Beispiel 5

Unterdrückung des kapazitiven Stromanteils durch Anwendung eines Ultra-Mikroelektroden-Arrys:

Wird die Oberfläche der Arbeitselektrode verkleinert, so verringert sich die zugehörige Doppelschichtkapazität wesentlich stärker als die faradaysche Stromdichte, d. h. das Verhältnis von faradayschem Strom (der analytproportional ist) zu kapazitivem wird extrem verbessert, so daß extrem schnelle Potentialänderungsgeschwindigkeiten vom  $> 500 \text{ V/sec}$  möglich werden. Zu-



sätzlich sorgen die veränderten Diffusionsbedingungen für die elektroaktive Species zu einer anderen Signalform. Ultra-Mikroelektroden (Durchmesser  $< 10 \mu\text{m}$ ) erlauben zum Unterschied zu einer planaren Diffusion bei Makroelektroden sphärische Diffusionsbedingungen und setzen so wenig Substanz um, daß es zu keiner in die Lösung hineinwachsenden Verarmungsschicht kommt, was sich im Voltammogramm durch eine klare Stufe und ein stabiles Grenzstromplateau zeigt. Die Abb. 10 zeigt den Unterschied zwischen einem zyklischen Voltammogramm einer Spur eines Redoxsystems bei einer Makroelektrode und einem Ultra-Mikroelektroden-Array der in Abb. 3 offenbarten geometrischen Anordnung. Das Array hat genau die gleichen Eigenschaften wie eine einzelne Ultra-Mikroelektrode, hat jedoch den Vorzug, daß die Stromstärke entsprechend der Anzahl der Elektroden vergrößert ist.

#### Beispiel 6

Anordnung für eine besonders einfache Ausführungsform:

Anstelle der erzwungenen Strömung bei der Fließinjektionsanalyse können vorzugsweise auch Kapillarkräfte herangezogen werden. Neben dem Prinzip der Papier und Dünnschichtchromatographie können auch andere Träger für die immobilisierten Partnermoleküle verwendet werden. Ein Beispiel dafür kann ein Stück einer säulenförmigen Kreide (oder Sinterglas/keramik) darstellen. Hier werden bei haptenähnlichen Analyten die Antikörpermoleküle schon vor der Immobilisierung an der Kreideoberfläche mit den markierten Analytmolekülen abgesättigt. Die Immobilisierung kann durch einfaches Eintauchen in dieser Lösung geschehen, wobei man die Laufstrecke beobachten kann. Die Molekül-Assoziate werden mittels bifunktionaler Reagenzien quervernetzt bzw. an der Oberfläche fixiert. Von dieser primären immunologischen Zone wird, getrennt durch eine unbehandelte Fließstrecke, eine zweite Molekül-Sammelzone errichtet. Aus Gründen einer hohen Empfindlichkeit genügt hierbei ein schmaler Bereich unmittelbar am Ende des Kreideträgers. Im Beispiel wird die Endoberfläche mit den gleichen Antikörpern versehen, die auch in der primären immunologischen Zone verwendet wurden, nur mit dem Unterschied, daß hier die analytselektiven Bindungsstellen frei sind, so daß sie die durch den unmarkierten Analyten in der Probe freigesetzten markierten Analytmoleküle wieder auf sammeln und auf kleinstem Raum konzentrieren. Die elektrochemische oder fluorimetrische Messung erfolgt dann auf der polierten Endfläche der Kreidesäule. Die Strömung eines Trägerelektrolyten oder der Probe durch die Kapillarkräfte wird durch Aufsetzen eines saugfähigen Pfropfens auf diese Endfläche aufrechterhalten. Die vermessene Probenmenge muß aus der Abnahme des Probenvolumens ermittelt werden.

Wird bei der Erfindung ein Träger (z. B. Durchflusssäule, Fließpapier, Membranfilter etc. verwendet, an dem ein Partner gebunden ist, wird dieser mittels einer kompetitiven Reaktion durch den unmarkierten Analyten verdrängt. Er wird jedoch am Ausgang der Säule noch vor der Messung erneut von immobilisierten Komplementmolekülen gebunden und dadurch zur eigentlichen Messung angereichert, wobei gleichzeitig auch störende Begleitstoffe durch Spülen entfernt werden können, bevor die extrem empfindliche elektrochemische oder optische Messung repetitiv durchgeführt wird und durch Signalmittelwertbildung das Signalzu-

Rausch-Verhältnis beliebig gesteigert wird.

#### Literatur:

- 5 1) S. Wüst, U. Doht, Th. Giersch, Ch. Wittmann, B. Hock, GIT, Fachz. Lab. 2 (1990) 99—106.
- 2) B. Hock, Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 22 (1989) 78—84.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung besonders empfindlicher Immuno-Assays und weiteren Assays, die auf Molekül-Rezeptor-, DNA-komplementär-DNA-Strang sowie Gast-Wirtsmolekül-Wechselwirkungskräften beruhen, **gekennzeichnet durch** schnelle und repetitive Messungen der Stromstärke oder des Fluoreszenzlichtes und Doppelmessung und Vergleich/Quotientenbildung in mindestens zwei Meßzonen bzw. Kalibrierung analog der Methode des inneren Standards, unter Verwendung stabiler redox- oder IR-fluoreszenzmarkierter Analytmoleküle bei immuno Assays und ähnlichen Assays.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als analyterkennende Moleküle oder Molekülassoziationen die jeweiligen Partner der sich extrem selektiv verbindenden Molekül-Paare: Antikörper (Antikörperfragment mit Bindungsstelle) — Antigen, Molekül — Rezeptor, DNA-Abschnitt — komplementärer DNA-Abschnitt sowie Gastmolekül — Wirtsmolekül an besonderen Oberflächen und in bestimmten Zonen verteilt immobilisiert verwendet werden.
3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zum Analyten komplementäre Partnermolekül an einem stationären Träger an zwei getrennten Zonen immobilisiert wird, wobei die Moleküle der ersten Zone zu Beginn einer Analyse mit dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül abgesättigt werden, so daß dadurch alle Bindungsstellen blockiert sind und bei Kontakt mit dem nicht markierten Analytmolekül aus der Probe eine Verdrängung der markierten Analytmoleküle stattfindet, wobei letztere aber an anderer Stelle der Vorrichtung auf möglichst kleinem Volumen wieder gesammelt werden, bevor sie elektrochemisch oder optisch repetitiv bis zum gewünschten Signal/Rauschverhältnis vermessen werden.
4. Vorrichtung nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß neben der Verdrängungsreaktion auch eine kompetitive Bindungsreaktion zwischen dem unmarkierten Analytmolekül in einer Probe und dem redox- oder fluoreszenzmarkierten Analytmolekül, das jeder Probe im bekannten Verhältnis zugegeben werden muß, an trägergebundene Partnermoleküle ablaufen kann, wobei hier nach Spülung der nicht gebundenen Moleküle und Entfernen der Probenmatrix die repetitive elektrochemische oder optische Messung erfolgen kann.
5. Vorrichtung nach Anspruch 2—4, dadurch gekennzeichnet, daß die betreffenden analyterkennenden Komplementmoleküle auf Trägeroberflächen immobilisiert sind, die die repetitive elektrochemische oder optische Messung ermöglichen, also entweder den innigen Kontakt mit einer planaren elektrochemischen Drei-Elektroden-Meßzelle

erlauben bzw. die Messung des IR-Fluoreszenzlichtes ermöglichen.

6. Vorrichtung nach Anspruch 2—5, dadurch gekennzeichnet, daß als Träger für die an bestimmten Stellen fixierten analyterkennenden und selektiv bindenden Komplementmoleküle neben dem typischen Mikrotitermaterial Polystyrol vorzugsweise chromatographische stationäre Phasen, wie adsorbentiengefüllte Säulen, RP-18 ähnliche Materialien, Fließpapierstreifen, Membranfilterstreifen auf Cellulosebasis o. ä., die Kapillarflußeigenschaften haben, verwendet werden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 2—6, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Probenlaufstrecke (Art Affinitätschromatographischer Miniatursäule) mindestens eine primäre immunologische (oder allgemein: analytspezifisch bindende) Zone gegebenfalls zusammen mit einer weiteren Sammel- und Anreicherungszone vorhanden ist.

8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätschromatographische Abtrennung, Verdrängung oder kompetitive Anbindung entweder planar durchgeführt wird, so daß die planare elektrochemische Drei-Elektroden-Meßkette ungehinderten Kontakt mit unterschiedlichen Oberflächenabschnitten finden kann und auch die optische Messung alternativ zwischen einem Trägeruntergrund und den Meßzonen oszillieren kann.

9. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Sammel- und Anreicherungsphase eng begrenzte Zonen in der Proben-Fließrichtung hinter der primären immunogenen Zone (oberer Definition) angelegt werden, die aus den betreffenden analyterkennenden und -bindenden Komplementmolekülen bestehen, die aber freie Bindungsstellen haben und die so gesammelten redox-aktiven oder fluoreszierenden Analytmoleküle der repetitiven Messung zuführen.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß als zweite Sammel- und Anreicherungszone die Lipophilie der markierten Analytmoleküle dadurch ausgenutzt wird, daß anstelle der betreffenden Komplementmoleküle eine lipophile Zone mit öl- oder wachstetränkter Oberfläche oder RP-18 Material verwendet wird, wobei bei ionalen Analyten dieser Phase noch ein lipophiles Gegenion zur Ionenpaarbildung zugefügt wird.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungsphase für die in der primären Reaktionszone verdrängten markierten Analytmoleküle durch eine entsprechend der Molmasse des markierten Analytmoleküls gewählten Dialysmembran gegeben ist, die in einem gewissen Abstand zur primären Reaktionszone angebracht ist, und die sowohl stationär mittels aufgedampfter Elektroden wie auch demonstriert elektrochemisch vermessen werden kann.

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß diese Dialysiermembran zusätzlich an der in Fließrichtung an erster Stelle liegenden Oberfläche die analytbindenden Komplementmoleküle immobilisiert enthält.

13. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sammel- und Anreicherungszone dadurch erzielt wird, daß das Lösungsmittel durch Anwendung von Hitze und Transportgas am Ende der Probenlaufstrecke verdampft wird.

14. Vorrichtung nach Anspruch 2—13, dadurch gekennzeichnet, daß die primäre analyterkennende und -bindende Reaktionszone und die davon getrennte Sammel- und Anreicherungszone innerhalb eines teststreifenähnlichen Trägers mit Kapillarkräften liegt, so daß der Transport der flüssigen Probe durch die verschiedenen Zonen durch letztere erreicht werden kann und keine externe Pumpe notwendig ist, wobei die Auswertung über Konzentrationsproportionale Strecken oder integrale Signale über die charakteristischen Streckenabschnitte erfolgt und auch redundant ist. Das Auswertgerät ist hier ein Scanner mit optischer oder elektrischer Messung. Bei dem elektrochemischen Scannen werden walzenförmige Arbeitselektroden verwandt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 2—14, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Konzentration der redoxmarkierten Analytmoleküle auf den entsprechenden Oberflächenzonen der erfindungsgemäßen Vorrichtung durch die elektrochemische Methode der schnellen zyklischen Voltammetrie oder einer anderen Methode, die ohne Netto-Umsatz (Substanzverbrauch) arbeitet, mittels einer planaren Drei-Elektrodenmeßzelle, die zusammen mit einem geeigneten Grundelektrolyten auf diese Stellen gepreßt wird, erfolgt (Prinzip der Dünnschicht-Meßzelle).

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die planare oder quasi-planare elektrochemische Drei-Elektrodenmeßzelle anstelle einer Makro-Arbeitselektrode aus einem Edelmetall, wie Platin, Gold o. ä. ein Ultra-Mikroelektroden-Array aus den gleichen Materialien mit Einzelelektroden durchmessern  $< 10 \mu\text{m}$  enthält, um den bei schnellen zyklischen Voltammogrammen stark ansteigenden kapazitiven Strom zu verkleinern.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Arbeitselektrode oder das dazu benutzte Ultra-Mikroelektroden-Array in die betreffenden Zonen des Assays integriert sind.

18. Vorrichtung nach Anspruch 15—17, dadurch gekennzeichnet, daß das zyklische Voltammogramm mit einer hohen Repetitionsrate im Bereich 1 bis  $> 100 \text{ Hz}$  nicht wie üblicherweise auf einem X-Y-Schreiber, sondern auf einem elektronischen Mittelwertbildner registriert wird, der so geschaltet ist, daß die digitalisierten Stromsignale in beiden Potentialrichtungen auf ein und denselben spannungsproportionalen Kanal addiert werden, was wegen des unterschiedlichen Vorzeichens des kapazitiven Stromanteils bei den unterschiedlichen Änderungsrichtungen einer nahezu 100%igen Kompensation dieses störenden nichtfaradayschen Stromes gleichkommt, während die konzentrationsabhängigen Stromspitzen der Redoxmoleküle bei unterschiedlichen Potentialen auftreten und daher sich gegenseitig nicht kompensieren.

19. Vorrichtung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Arbeitselektrode das Ultra-Mikroelektroden-Array verwendet wird.

20. Vorrichtung nach Anspruch 15—19, dadurch gekennzeichnet, daß der Meßvorgang eines Analyten automatisch computergesteuert in der Weise abfolgt, daß sowohl die von der Anordnung aufgenommene Problemengruppe als auch die Sammelzeit reproduzierbar eingehalten werden und die repetiti-

ve elektrochemische Messung jeweils mit gleicher Zahl an Additionszyklen, die von dem Signal/Rauschverhältnis abhängt, durchgeführt wird.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Redox-Marker-Moleküle, die mit dem Analytmolekül kovalent verknüpft werden, Redox-Systeme mit besonders hoher Standardaustauschstromdichte verwendet werden, die sich im betreffenden Lösungsmittel oder in der Probenmatrix lösen.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß als besonders reversible Redox-Systeme wasserlösliche, stabile und lagerfähige Ferrocenderivate, Rutheniumkomplexe, Hydrochinone, Hexacyanoferrat (II/III), Jod/Jodid o. ä. verwendet werden, die über Spacermoleküle mit dem Analytmolekül verbunden werden.

23. Vorrichtung nach Anspruch 2—14, dadurch gekennzeichnet, daß als Markermoleküle für die repetitive optische Detektion stabile, lagerfähige spezielle Moleküle verwendet werden, die Licht der Wellenlänge  $> 700$  nm absorbieren und im langwelligeren Bereich wieder als Fluoreszenzlicht emittieren.

24. Vorrichtung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß als Molekülklasse für die vorteilhafte IR-Fluoreszenzmarkierung das Bis-isothiocyanat-Derivat von 2-(4'-chloro-7'-(3''-ethyl-2''-benzothiazolinylden)-3',5'-(1'''-propaned-yl)-1',3',5'-heptatrien-1'-yl)-3-ethylbenzothiazoliumbromid, Porphyrinderivate mit großen  $2n+1$  Pi-Elektronensystemen oder Phthalocyanine verwendet werden, die sich auch durch besonders hohe Extinktionskoeffizienten auszeichnen.

25. Vorrichtung nach Anspruch 2—14, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitive optische Messung, die dem Mittelwertbildner zugeführt wird dadurch erreicht wird, daß abwechselnd die zu messende fluoreszierende Oberflächenzone und der Trägeruntergrund an einer nicht mit der Sammelphase oder den Komplementärmolekülen bedeckten Stelle gemessen wird, was durch eine Relativbewegung des optischen Strahles erreicht werden kann.

26. Vorrichtung nach Anspruch 2—14, dadurch gekennzeichnet, daß als optische Anregungsquelle anstelle einer weißen Lichtquelle und eines Monochromators eine intermittierend betriebene Laserdiode im IR-Wellenlängenbereich mit hoher Strahlungsdichte, Monochromasie und Streulichtfreiheit zusammen mit einer Lock-In Verstärkungstechnik verwendet wird.

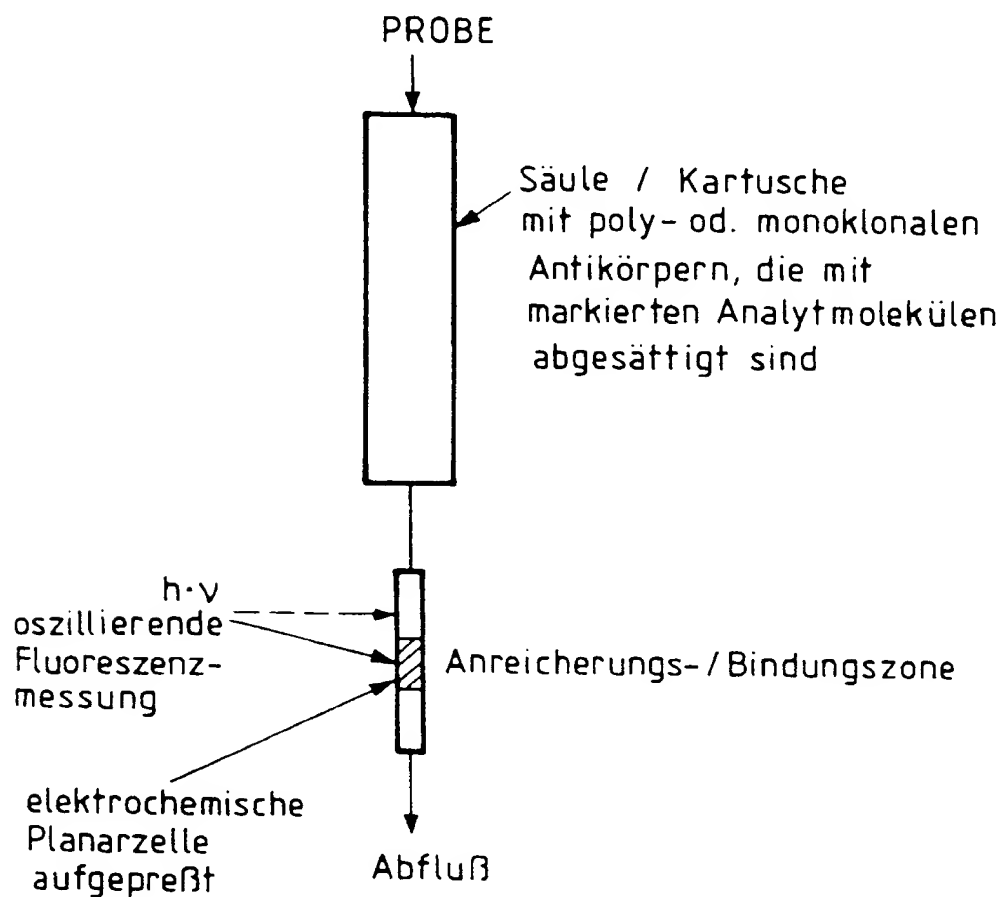
27. Verfahren zur Konzentrationsbestimmung eines Partners eines sich chemisch selektiv erkennen- den komplementären Molekülpaars (Antikörper-Antigen, Rezeptor-Rezeptormolekül, DNA-Sequenz-komplementärer DNA-Strang, Gast-Wirtsmolekül) mittels eines Immuno-Assays nach den Ansprüchen 1—26, dadurch gekennzeichnet, daß redox- und fluoreszenzmarkierte Analytmoleküle eingesetzt werden und die elektrochemische bzw. optische Messung der Verteilung dieser markierten Moleküle in den verschiedenen Zonen der Testvorrichtung ohne Materialverbrauch erfolgt, so daß beliebig viele repetitive Messungen möglich sind.

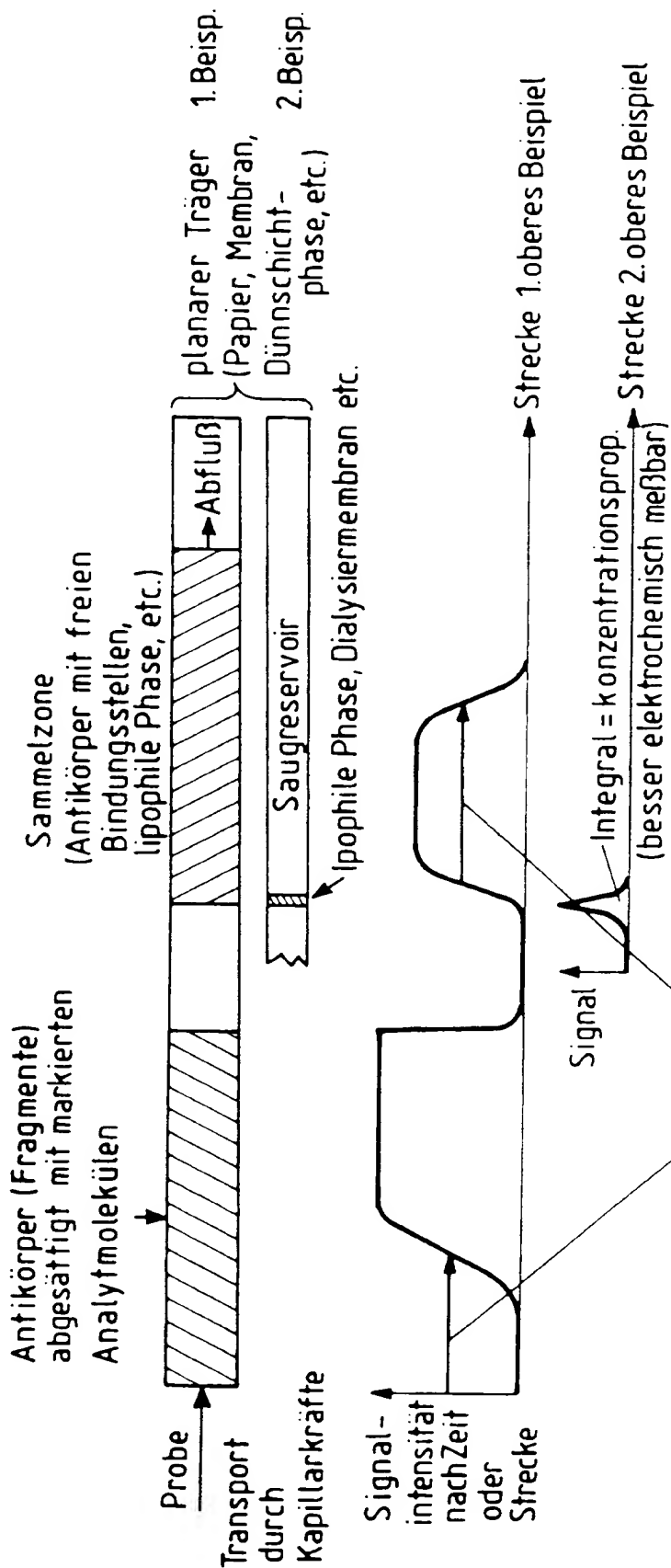
28. Verfahren nach Anspruch 27 und Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die repetitiven Messungen in reproduzierbarer Art und Weise einem Signalmittelwertsbildner zugefügt werden, so daß

das Signal/Rauschverhältnis zwischen dem faradayschen Strom und dem Untergrund sowie der Oberfläche mit den fluoreszierenden Molekülen und der freien Trägeroberfläche entscheidend verbessert wird.

Hierzu 15 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1



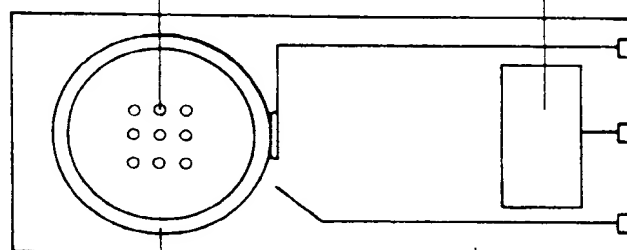


Strecke oder Integralwert des Signals = Konzentrationsproportional

Abb. 2



Mikroelektroden Gegenelektroden

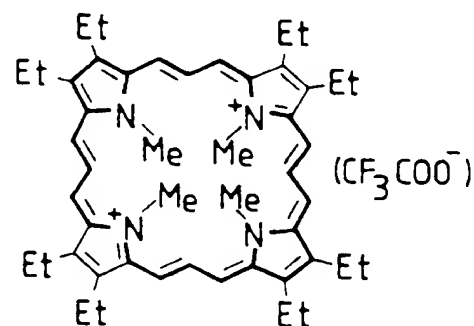
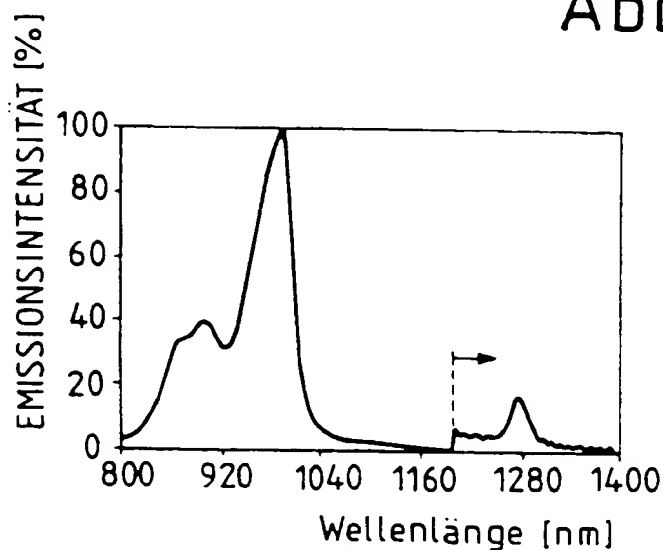


Referenz-  
elektrode

Wafer

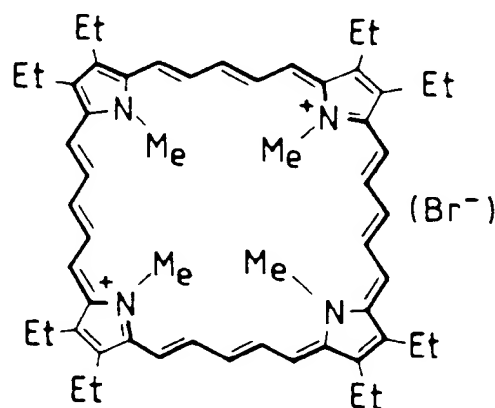
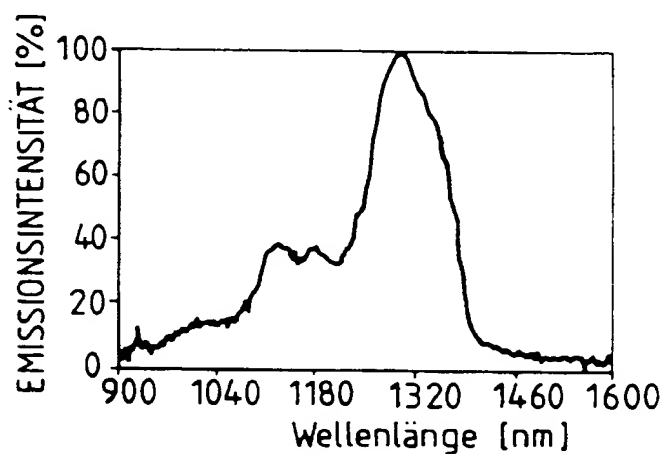
Abb. 3

## Abb. 4



Fluoreszenz-Spektrum: [26] Porphyrin-(3.3.3.3)

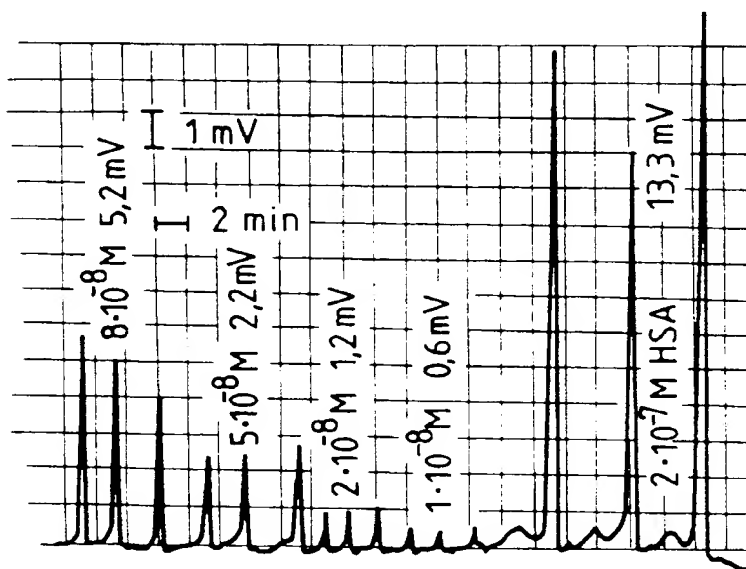
Anregungswellenlänge:  $\lambda = 546 \text{ nm}$

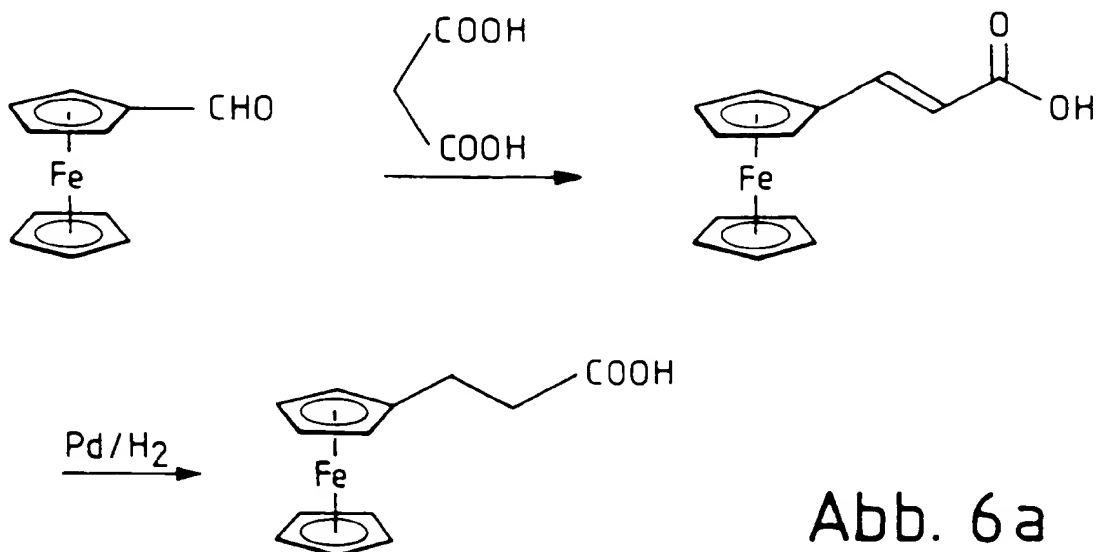


Fluoreszenz-Spektrum: [34] Porphyrin-(5.5.5.5)

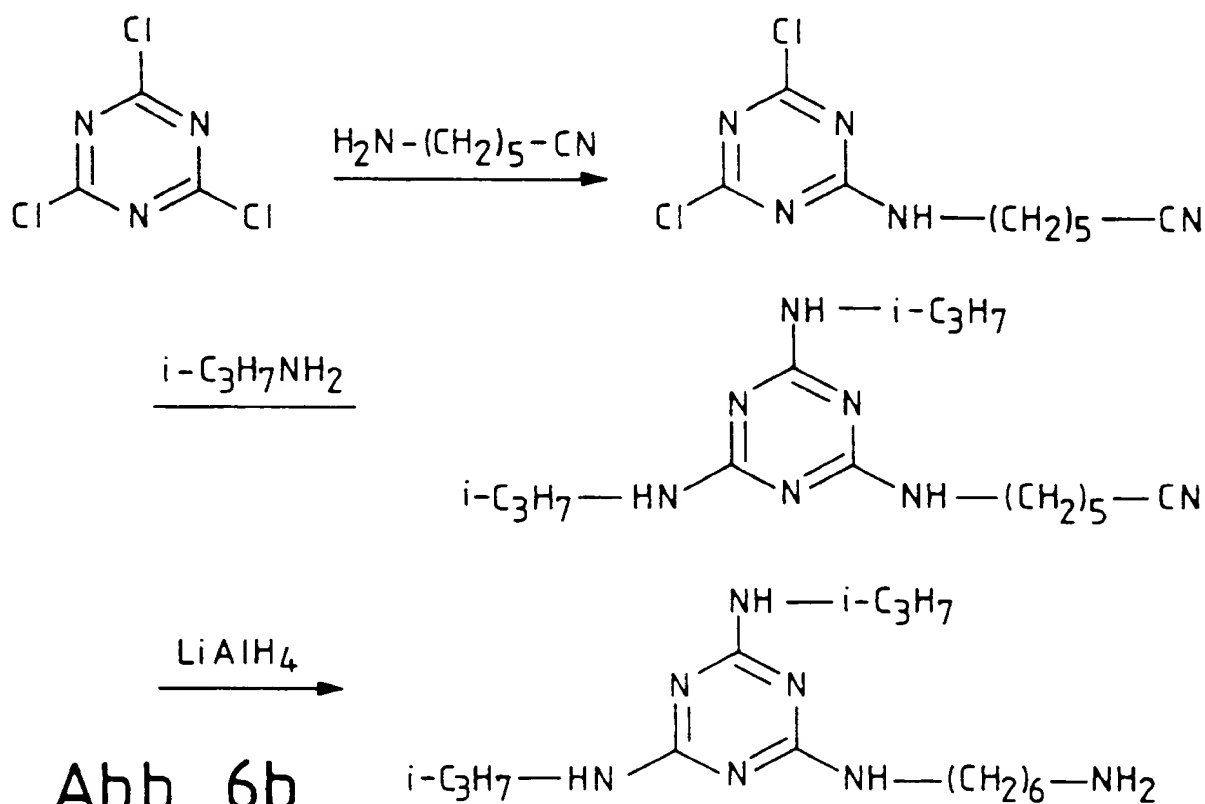
Anregungswellenlänge:  $\lambda = 578 \text{ nm}$

Abb. 5

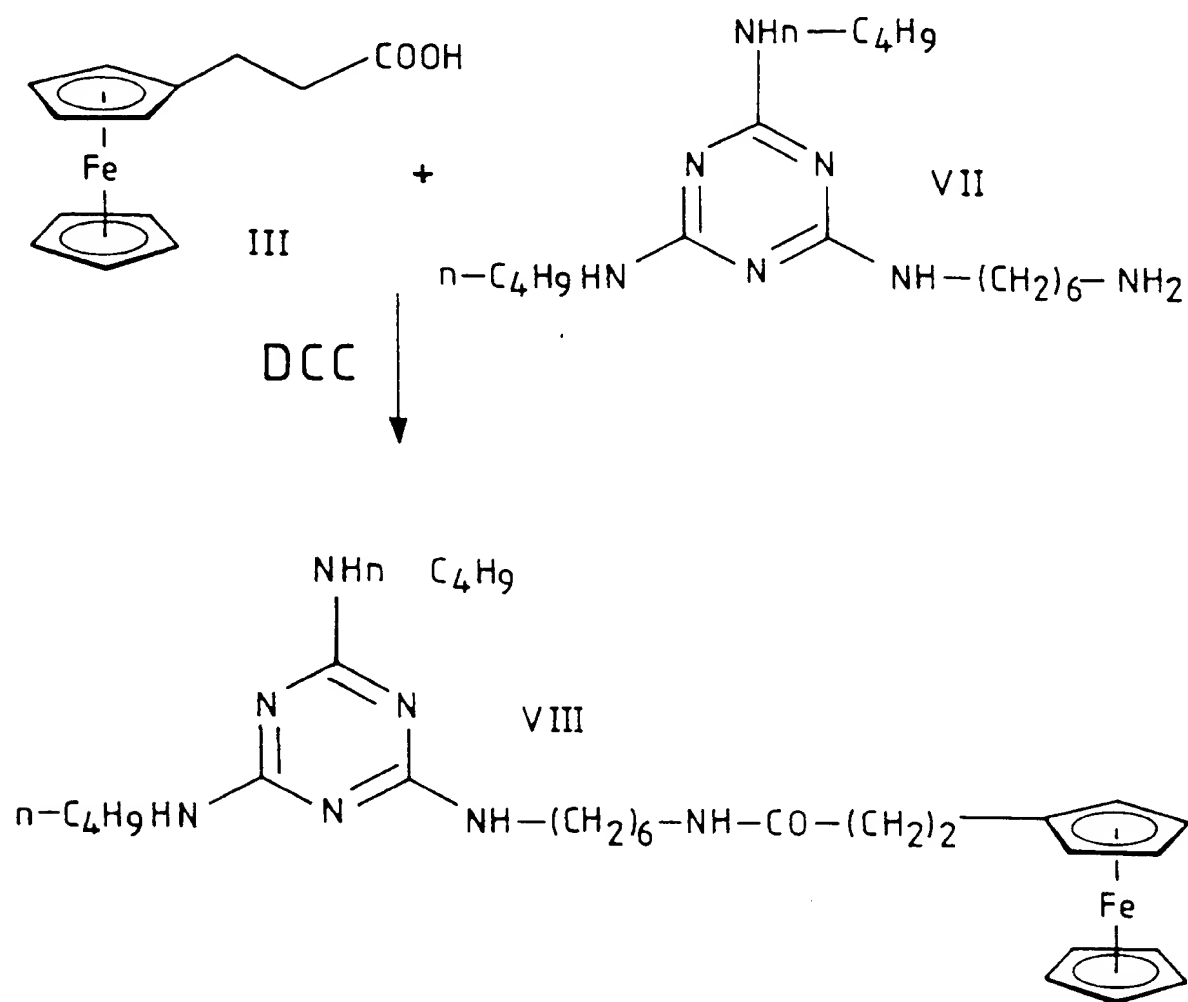




Die Synthese von 3-Ferrocenylpropionsäure



Die Synthese aminofunktionalisierter Triazinderivate

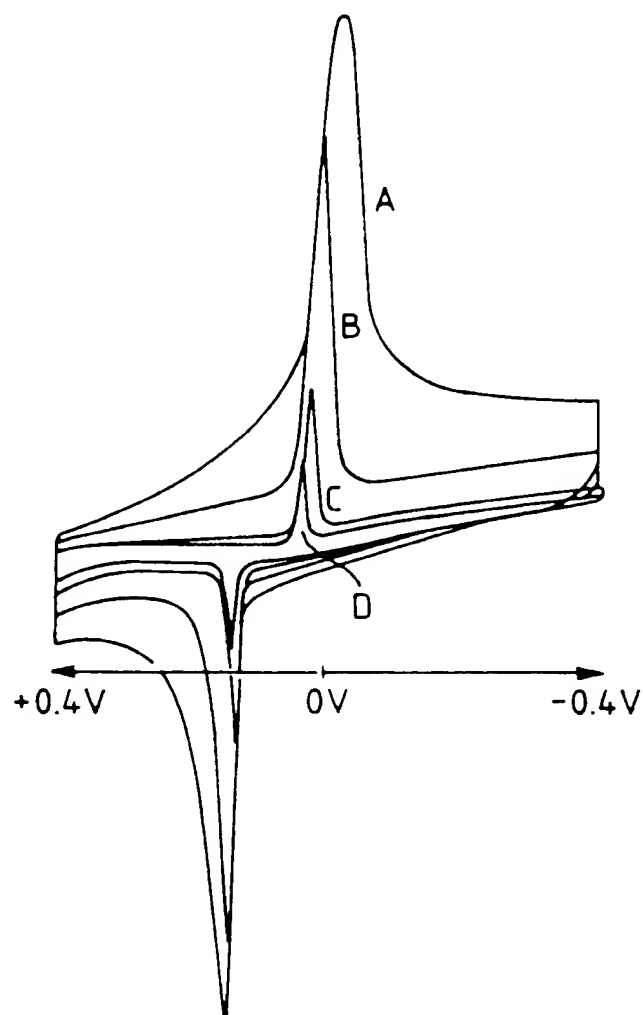


Die Umsetzung von 3-Ferrocenylpropionsäure mit einem aminofunktionalisierten Triazin zum Konjugat

Abb. 6c



Abb. 7



Stromstärke:  $15 \mu\text{A}/\text{cm}$ , Scanraten:

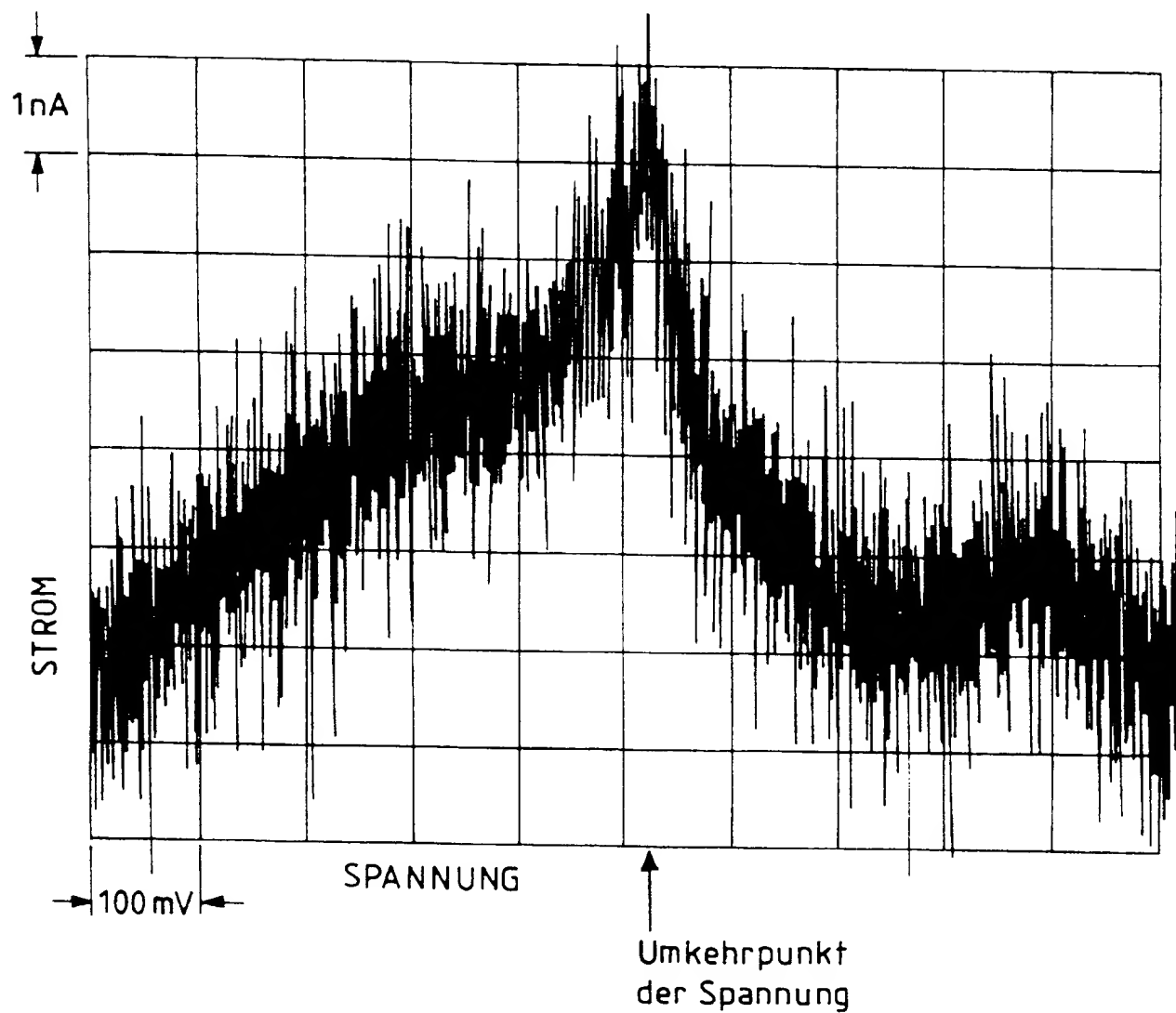
A:  $160 \text{ mV}/\text{sec}$

B:  $80 \text{ mV}/\text{sec}$

C:  $26.7 \text{ mV}/\text{sec}$

D:  $13.3 \text{ mV}/\text{sec}$

Abb. 8a



Methode: Cyclische Voltammetrie

Abb. 8b

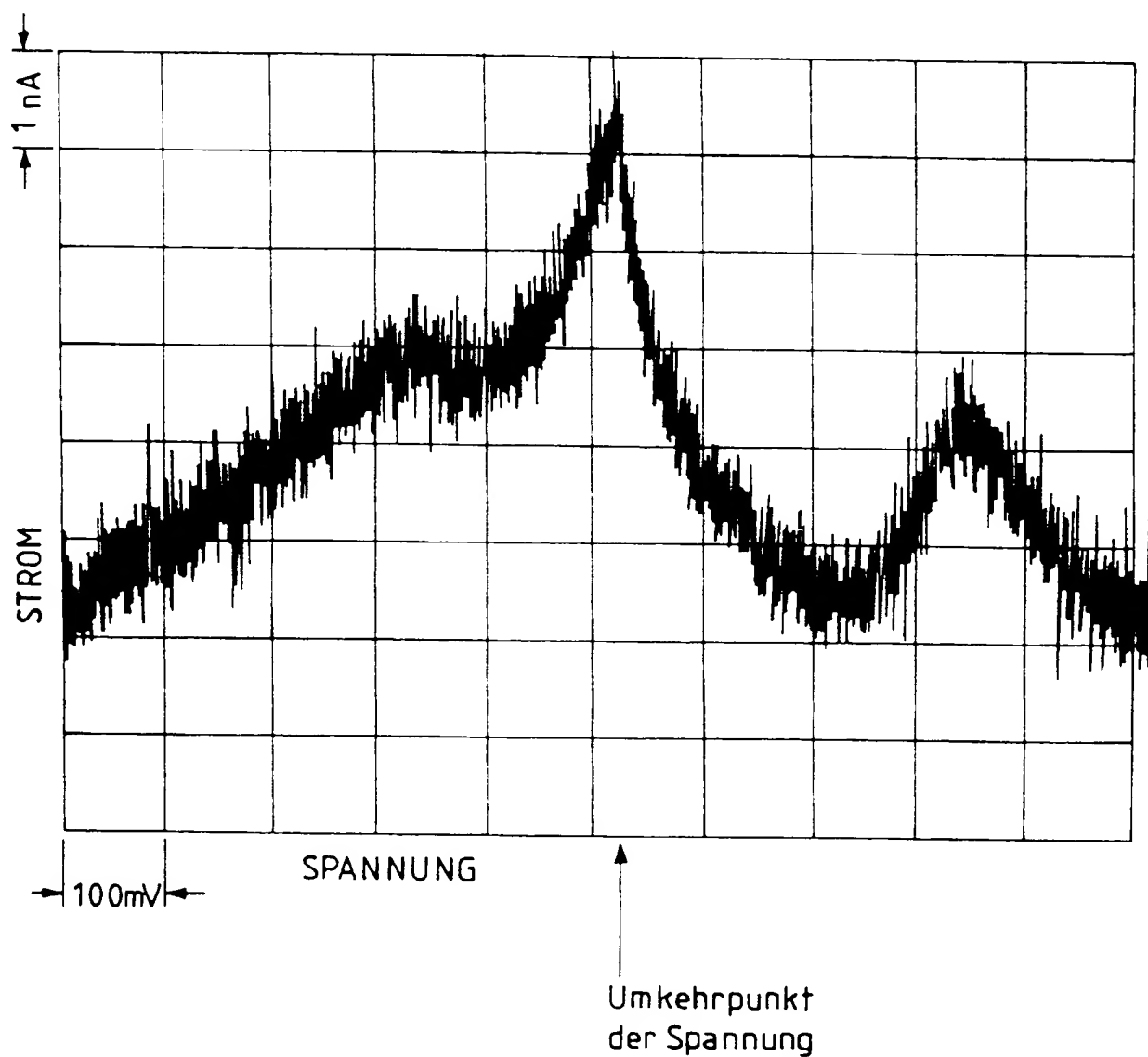


Abb. 8c

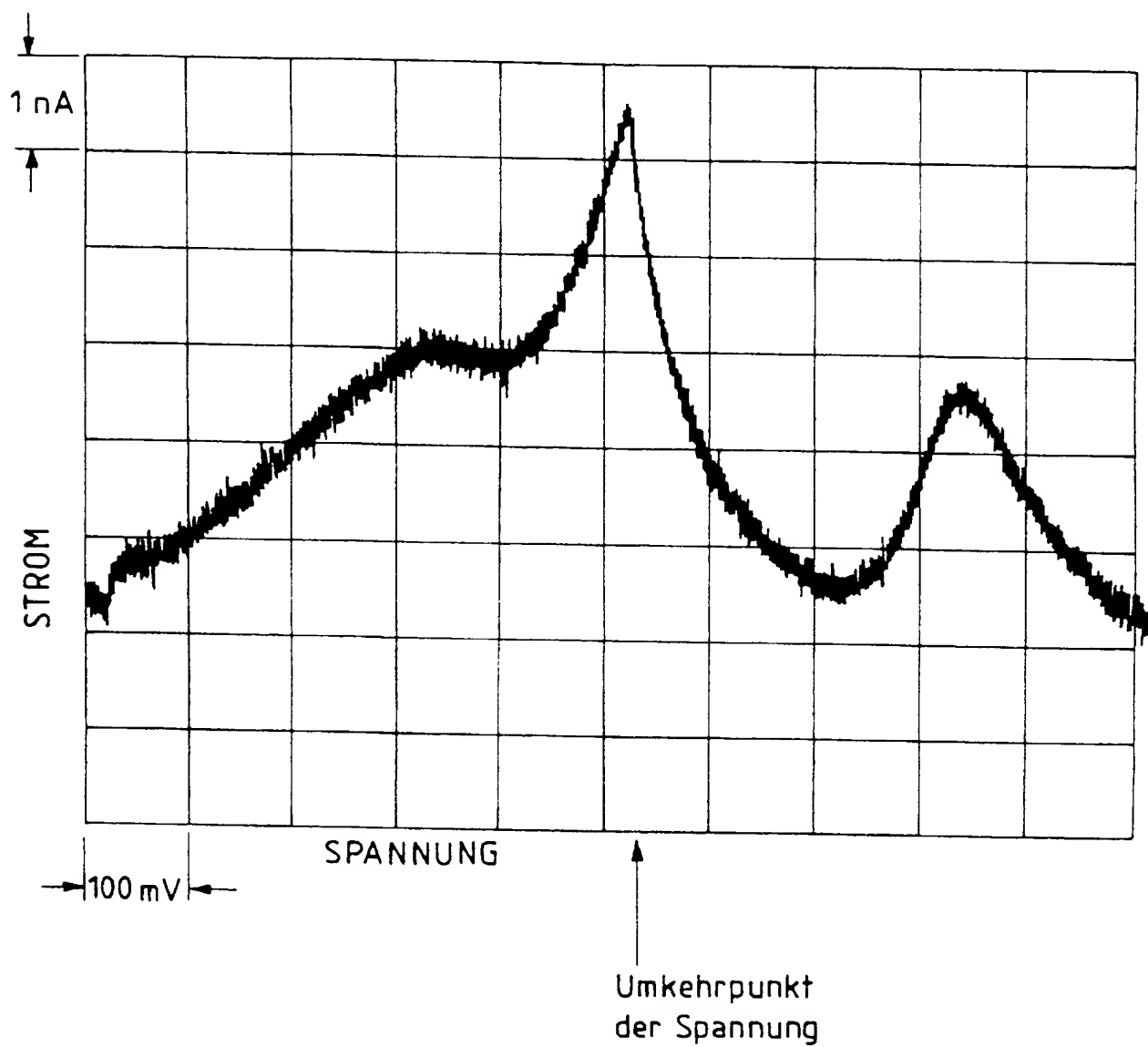


Abb. 8d

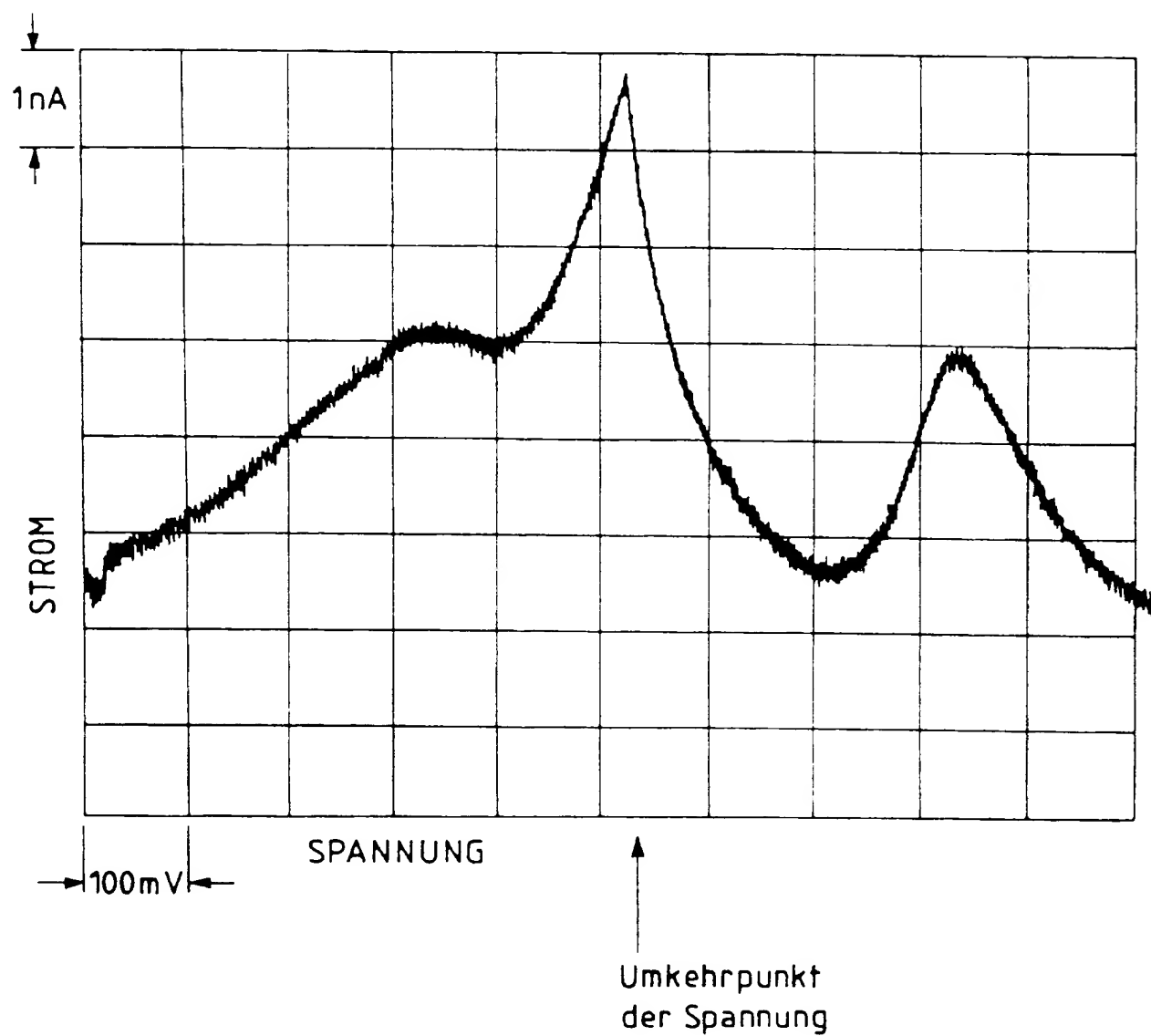
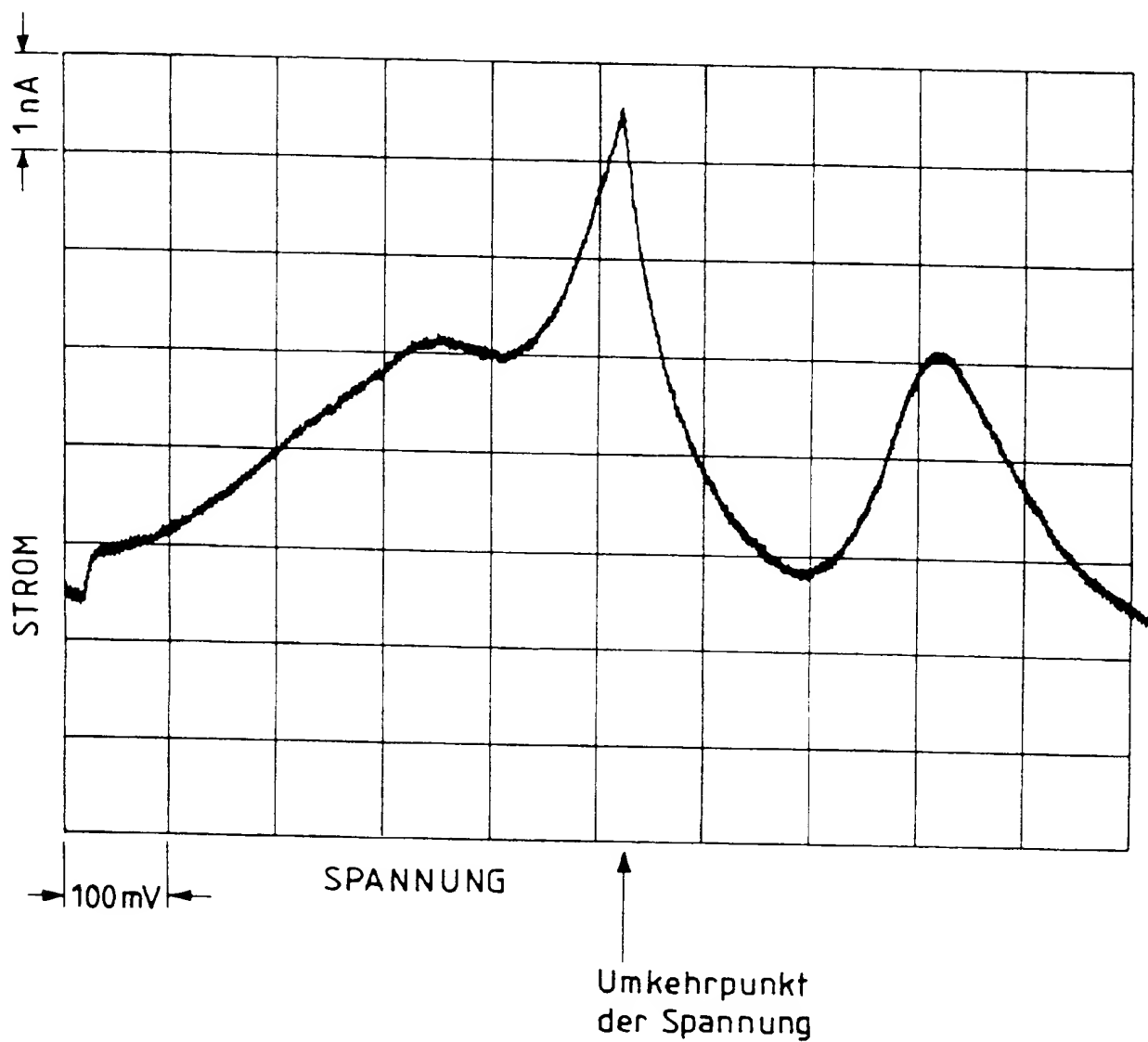




Abb. 8e



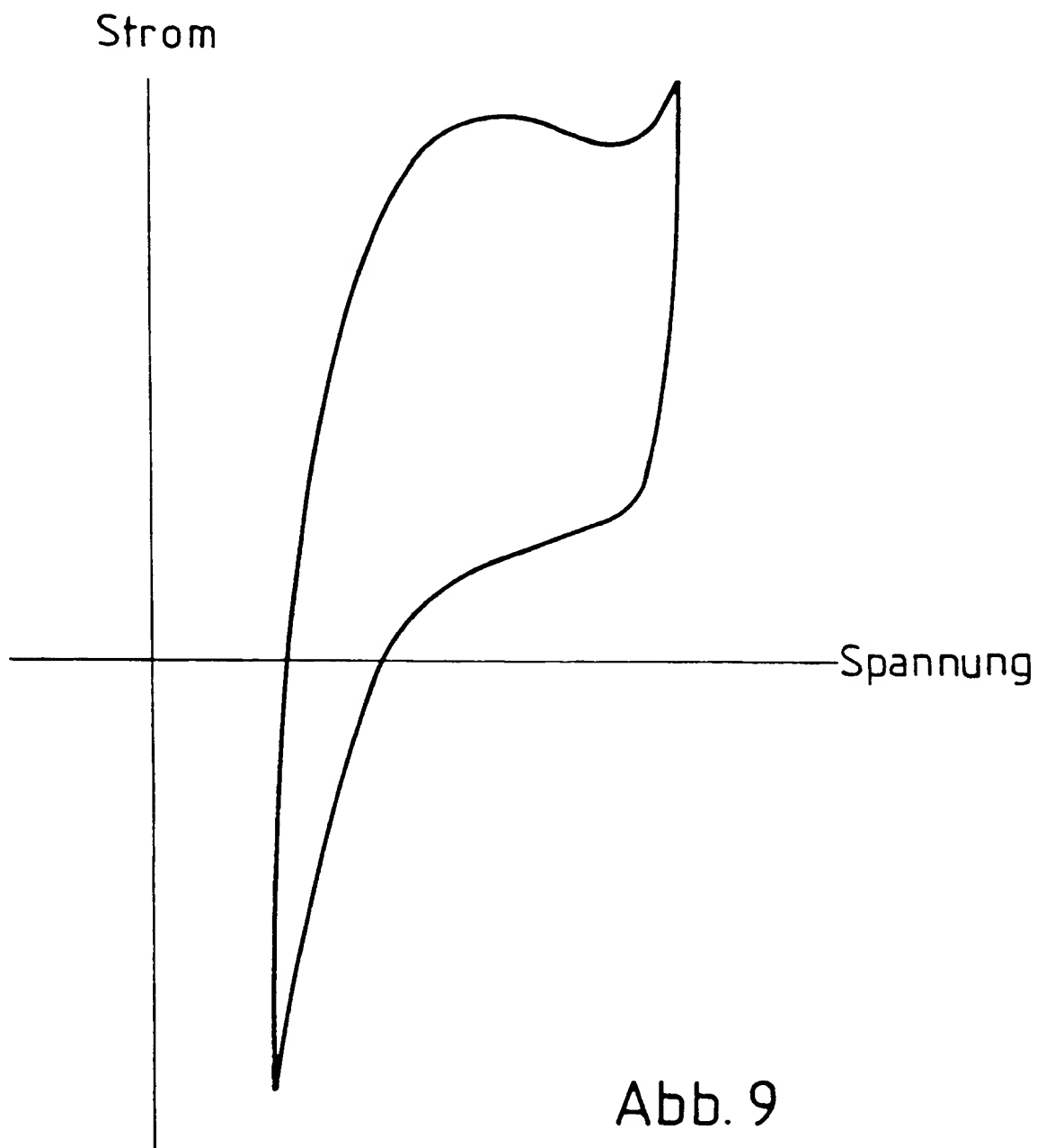


Abb. 9

Abb. 10a

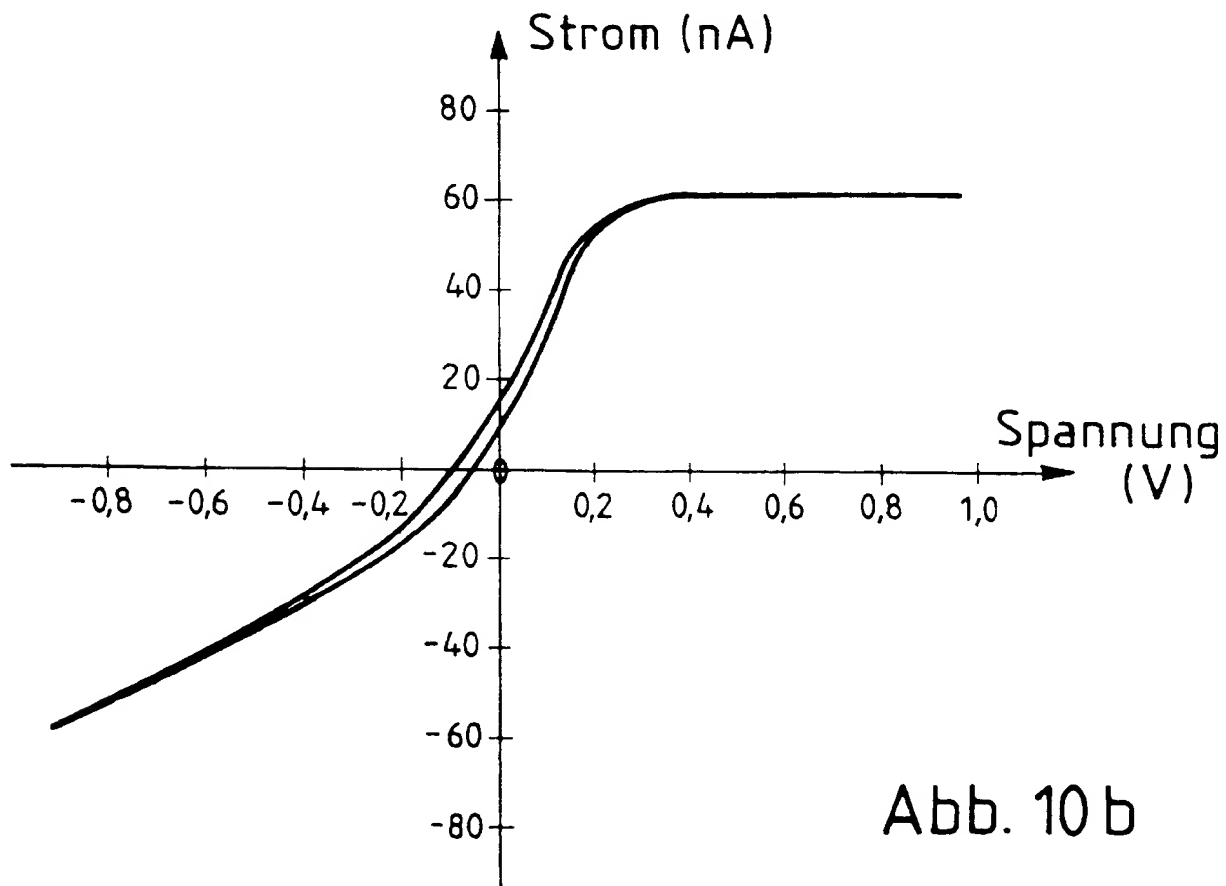
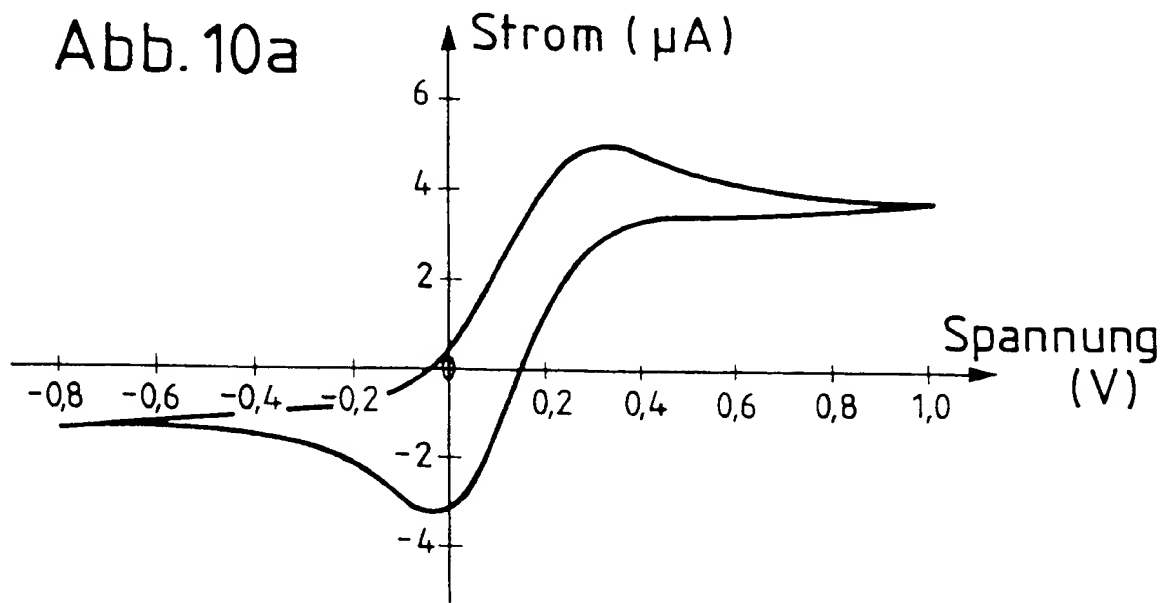


Abb. 10b